



# Geomicrobiology of Alchichica alkaline lake microbialites (Mexico)

Estelle Couradeau

## ► To cite this version:

Estelle Couradeau. Geomicrobiology of Alchichica alkaline lake microbialites (Mexico). Sciences de l'environnement. Université Paris-Diderot - Paris VII, 2012. Français. <tel-00934407>

**HAL Id: tel-00934407**

**<https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00934407>**

Submitted on 21 Jan 2014

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



**Thèse de doctorat de l'Université Paris Diderot (Paris 7)**  
**Sorbonne Paris Cité et École doctorale des Sciences de la Terre ED 109**  
Spécialité : **géochimie**

Présentée par :  
**Estelle COURADEAU**

Pour obtenir le grade de :  
**Docteur ès sciences de l'université Paris Diderot**

# **Géomicrobiologie des microbialites du lac alcalin d'Alchichica (Mexique)**

Soutenance en avril 2012

Composition du jury

Giovanni ALOISI  
Rutger DE WIT  
Magali ADER  
Crisogono VASCONCELOS  
Karim BENZERARA  
Purificación LOPEZ-GARCIA

Rappoteur  
Rapporteur  
Examineur  
Examineur  
Directeur de thèse  
Co-directeur de thèse



## Résumé

Les stromatolites sont des structures organo-sédimentaires formées grâce à l'activité des microorganismes. Ils dominent le registre fossile Précambrien et sont parmi les plus anciennes traces potentielles de vie sur Terre (datées à 3,5 Ga). Cependant les processus biotiques et abiotiques à l'origine de leur formation restent peu compris et ouvrent des débats sur leur interprétation. L'objectif central de ce travail est de contribuer à améliorer notre compréhension de la formation des microbialites modernes, en particulier du rôle et du devenir des microorganismes dans ces systèmes afin de mieux contraindre l'interprétation du registre fossile des stromatolites. Pour cela, nous avons étudié le système modèle des microbialites vivants du lac alcalin d'Alchichica (Mexique). La première partie de ce travail a été dédiée à la description générale des microorganismes et des minéraux du système. Les microbialites d'Alchichica sont composés d'aragonite [ $\text{CaCO}_3$ ] et d'hydromagnésite [ $\text{Mg}_5(\text{CO}_3)_4(\text{OH})_2 \cdot 4(\text{H}_2\text{O})$ ]. L'analyse de la diversité microbienne par des méthodes moléculaires basées sur le clonage et le séquençage du SSU rDNA a révélé une grande diversité dans le domaine des bactéries (344 phylotypes répartis dans 21 phylums) et des eucaryotes (58 phylotypes répartis dans 9 phylums) en regard d'une faible diversité d'archées (2 phylotypes). Des analyses de phylogénie moléculaire ont permis d'attribuer ces phylotypes environnementaux à différents taxons et d'identifier les représentants cultivés les plus proches, ce qui a permis de définir les groupes métaboliques potentiellement importants dans ce système. Dans les microbialites d'Alchichica, la photosynthèse oxygénique est réalisée par les cyanobactéries, les algues vertes et les diatomées. Une grande diversité d'organismes incluant des membres des Alpha-proteobacteria et des Chloroflexi réalisent quant à eux la photosynthèse anoxygénique. Si le biofilm est dominé par les organismes autotrophes en termes de biomasse, la diversité taxonomique des organismes hétérotrophes s'est révélée supérieure. Nous avons notamment identifié des membres des Deltaproteobacteria et des Firmicutes réalisant la sulfato-réduction, ainsi qu'une grande diversité de taxons capables de dégrader des molécules organiques complexes tels que les Planctomycetales, les Bacteroidetes et les Verrucomicrobia. Ces résultats nous ont permis de construire un modèle hypothétique des réactions métabolico-géochimiques contribuant à la précipitation ou dissolution des carbonates au sein des biofilms des microbialites d'Alchichica. Dans la seconde partie de ce travail, nous avons décrit une association préférentielle entre les colonies de cyanobactéries de l'ordre des Pleurocapsales et l'aragonite. Nous avons pour cela couplé différentes techniques de microscopie et de spectroscopie. Nous avons décrit un gradient de fossilisation de ces cellules dans l'aragonite jusqu'à la nano-échelle. Ceci a montré que l'ultrastructure des cellules des Pleurocapsales était préservée lors de la minéralisation grâce à la mise en place séquentielle d'aragonite. C'est finalement la texture de l'aragonite et non pas la présence de matière organique qui signe l'organisation originelle des cellules de Pleurocapsales. Cette étude ouvre des perspectives intéressantes dans la recherche de microfossiles de cyanobactéries dans les stromatolites fossiles. La troisième partie enfin rapporte la découverte d'un cas de biominéralisation intracellulaire contrôlée chez une cyanobactérie de l'ordre basal des Gloeobacterales. Nous avons nommé cette souche *Candidatus Gloeomargarita lithophora*. Les inclusions intracellulaires produites par *Ca. G. lithophora* sont des carbonates amorphes de Ba-Sr-Ca-Mg. Les implications de la découverte de ce nouveau patron de minéralisation



dans une lignée basale de cyanobactéries pour l'interprétation du registre fossile ancien sont discutées.

## Abstract

Stromatolites are organosedimentary structures resulting from the activity of microbes. Fossil stromatolites are considered to be among the oldest traces of life on Earth, their oldest occurrence being at 3.5Ga. Although stromatolites dominate the Precambrian geological record, the abiotic and biological processes leading to their formation and thus the exact information that can be retrieved from them are still poorly understood. The main objective of this work was to study the formation of modern microbialites in order to better constrain the interpretation of the fossil ones. With this aim, we studied living microbialites from the alkaline Lake Alchichica in Mexico as a model system. The first part of this work has been devoted to the description of Alchichica microbialites including mineral phases and the associated microbial diversity. Alchichica microbialites are composed of aragonite [ $\text{CaCO}_3$ ] and hydromagnesite [ $\text{Mg}_5(\text{CO}_3)_4(\text{OH})_2 \cdot 4(\text{H}_2\text{O})$ ]. Cultivation-independent molecular methods revealed a high diversity of bacteria (344 phylotypes distributed in 21 phyla) and microbial eukaryotes (58 phylotypes distributed in 9 phyla) in contrast with a low diversity of archaea (2 phylotypes). Molecular phylogenetic analyses allowed us to identify the closest cultivated members of the different phylotypes retrieved. This information was used to predict which metabolisms are putatively important in Alchichica microbialites. Oxygenic photosynthesizers were dominated by cyanobacteria, green algae and diatoms. Anoxygenic photosynthesizers were also diverse, comprising members of Alphaproteobacteria and Chloroflexi. Although photosynthetic microorganisms dominated the biomass, heterotrophic lineages were more diverse. We found sulphate-reducing lineages among Deltaproteobacteria and Firmicutes and very diverse taxa likely able to degrade complex polymeric substances, such as Planctomycetales, Bacteroidetes and Verrucomicrobia. Based on this, we build a hypothetical model of metabolic–geochemical reactions leading to carbonate precipitation or dissolution in Alchichica microbialites. In a second chapter, we describe a combination of microscopic and spectroscopic studies to study cyanobacteria-carbonate phase assemblages. We showed a preferential association between cyanobacterial colonies belonging to the order Pleurocapsales and aragonite. We described the early stages of fossilization of Pleurocapsales cells within aragonite down to the nanoscale. This reveals that microfossils of these cyanobacteria can be recognized even if the cells are totally encrusted. The mineralization sequence produces successive layers of aragonite whose textural organization points out the initial cells ultrastructures. This study opens new perspectives in the research of calcified cyanobacteria in ancient rocks. The third part reports the discovery of a cyanobacterium capable of performing controlled intracellular carbonate biomineralization. This strain, that we tentatively called *Candidatus Gloeomargarita lithophora* belongs to the basal cyanobacterial order of the Gloeobacterales. Intracellular inclusions formed by *Ca. G. lithophora* are amorphous Ba-Sr-Ca-Mg carbonates. The discovery of this new pattern of biomineralization in a basal order of cyanobacteria opens new perspectives for the interpretation of ancient fossil record.

# Sommaire

Liste des abréviations.....	1
Introduction .....	3
I. Les stromatolites fossiles .....	5
A. Des vestiges des plus anciennes traces de vie terrestre ? .....	5
1. Les stromatolites dans le registre fossile .....	7
2. Implications pour notre compréhension de la Terre ancienne et de son évolution jusqu'à l'actuel .....	9
B. Les microfossiles.....	10
1. La controverse historique des « microfossiles de Schopf » .....	10
2. Des critères pour la biogénicité ? .....	11
3. Les « calcimicrobes » et l'énigme précambrienne .....	12
C. Les biosignatures .....	14
1. L'ADN ancien.....	14
2. Les lipides (biomarqueur s.s.) .....	15
3. Les isotopes du carbone .....	16
4. Les marqueurs minéralogiques .....	17
II. Les microbialites actuels .....	18
A. Composante microbienne des microbialites .....	20
1. Présentation de la diversité des microorganismes .....	20
2. Organisation des microorganismes en biofilms .....	29
B. Modèle de précipitation des carbonates .....	30
1. Deux éléments requis : sursaturation et point de nucléation .....	30
2. Le rôle des EPS (exo-polymeric substances) .....	31
3. La biominéralisation : résultat net des interactions entre groupes fonctionnels de microorganismes .....	32
Objectifs & Plan de ma thèse .....	38
Matériel et méthodes.....	41
I. Présentation du système d'étude : le lac d'Alchichica.....	41
A. Paramètres physico-chimiques du lac d'Alchichica .....	41
B. Les échantillons et les cultures .....	42
II. Méthodes d'analyse .....	47
A. Caractérisation de la diversité microbienne.....	47
1. Extraction d'ADN .....	47
2. Clonage et séquençage du gène SSU rDNA .....	48
3. Electrophorèse sur gel à gradient dénaturant (DGGE).....	50
4. Reconstruction phylogénétique .....	51
B. Microscopies et spectroscopies : caractérisation des assemblages minéraux-microorganismes.....	51
1. Diffraction des rayons X .....	51
2. Imagerie plein champ, à épifluorescence et confocale .....	51
3. Microscope électronique à balayage (SEM) et spectroscopie EDX .....	52
4. Couplage SEM et CLSM (Confocal laser scanning microscopy).....	52
5. Préparation d'échantillons par FIB (Focused Ion Beam).....	53
6. Microscope électronique à transmission et diffraction électronique (SAED) .....	53
7. Spectro-microscopie d'absorption des rayons X, STXM .....	53
C. Suivi de la chimie des aquariums.....	54

<b>Chapitre 1 : Description générale des microbialites d'Alchichica .....</b>	<b>55</b>
<b>I. Minéralogie des microbialites d'Alchichica.....</b>	<b>56</b>
A. <i>Aragonite et hydromagnésite .....</i>	<i>56</i>
B. <i>Distribution spatiale des phases minérales .....</i>	<i>57</i>
C. <i>Présence d'organismes endolithiques.....</i>	<i>60</i>
<b>II. Résumé de l'article n°1.....</b>	<b>62</b>
A. <i>Contexte &amp; Objectifs.....</i>	<i>62</i>
B. <i>Principaux résultats &amp; Éléments de discussion.....</i>	<i>63</i>
<b>III. Manuscrit de l'article n°1 .....</b>	<b>66</b>
<b>Chapitre 2 : Précipitation extracellulaire de carbonates par les cyanobactéries.....</b>	<b>97</b>
<b>I. Résumé de l'article n°2.....</b>	<b>98</b>
A. <i>Contexte &amp; Objectifs.....</i>	<i>98</i>
B. <i>Principaux résultats &amp; Éléments de discussion.....</i>	<i>100</i>
<b>II. Manuscrit de l'article n°2 (en préparation) .....</b>	<b>102</b>
<b>III. Données supplémentaires.....</b>	<b>125</b>
A. <i>Panorama des échantillons le long du gradient de profondeur d'échantillonnage dans le lac.....</i>	<i>125</i>
B. <i>Les autres microorganismes photosynthétiques.....</i>	<i>127</i>
C. <i>Étude de l'échantillon subfossile AL10.....</i>	<i>128</i>
<b>Chapitre 3 : Précipitation intracellulaire de carbonates par les cyanobactéries .....</b>	<b>137</b>
<b>I. Résumé de l'article n°3.....</b>	<b>138</b>
A. <i>Contexte &amp; Objectifs.....</i>	<i>138</i>
B. <i>Principaux résultats &amp; Éléments de discussion.....</i>	<i>138</i>
<b>II. Manuscrit de l'article n°3 .....</b>	<b>140</b>
<b>III. Données supplémentaires.....</b>	<b>170</b>
A. <i>Données de CLSM et SEM sur les cultures de Ca. Gloeomargarita lithophora.....</i>	<i>170</i>
B. <i>Une deuxième souche capable de biominéralisation intracellulaire dans l'ordre des Chroococcales .....</i>	<i>173</i>
<b>Discussion générale et Perspectives .....</b>	<b>178</b>
A. <i>Comment se forment les microbialites du lac d'Alchichica ? .....</i>	<i>178</i>
B. <i>Apports pour la recherche et la reconnaissance des biosignatures.....</i>	<i>180</i>
C. <i>Précipitation extracellulaire vs. intracellulaire de minéraux carbonatés par les cyanobactéries .....</i>	<i>181</i>
<b>Conclusions.....</b>	<b>186</b>
A. <i>Minéralogie des microbialites d'Alchichica .....</i>	<i>186</i>
B. <i>Diversité microbienne associée aux microbialites.....</i>	<i>186</i>
C. <i>Fossilisation des Pleurocapsales dans l'aragonite.....</i>	<i>187</i>
D. <i>Biominéralisation intracellulaire chez Ca. Gloeomargarita lithophora .....</i>	<i>188</i>
<b>Bibliographie.....</b>	<b>189</b>
<b>Annexes .....</b>	<b>203</b>
<b>Annexe 1</b> <i>Composition du milieu 539 – BG11 (Fiche collection Institut Pasteur).....</i>	<i>203</i>
<b>Annexe 2</b> <i>Protocole d'amplification PCR pour la création de banque de clone et la vérification de la présence d'insert avant séquençage .....</i>	<i>204</i>
<b>Annexe 3</b> <i>Protocole d'amplification PCR avant migration DGGE .....</i>	<i>205</i>
<b>Annexe 4</b> <i>Résumé des données issues du clonage du SSU rDNA des bactéries.....</i>	<i>206</i>
<b>Annexe 5</b> <i>Résumé des données issues du clonage du SSU rDNA des eucaryotes .....</i>	<i>220</i>
<b>Annexe 6</b> <i>Résumé des données issues du clonage du SSU rDNA des archées avec des amorces générales des archées .....</i>	<i>223</i>

## Liste des abréviations

ADN, DNA: Acide désoxyribonucléique

ARN, RNA: Acide ribonucléique

CLSM: Confocal Laser Scanning Microscopy

CCM : Carbon Concentrating Mechanism

DGGE: Denaturing Gradient Gel Electrophoresis

DRX : Diffraction des rayons X

EDX : Energy-dispersive X-ray spectroscopy

EPS : Exo-polymeric substances

Ga : Giga-année ( $10^9$  ans)

GOE : Great Oxidation Event

OTU: Operational Taxonomic Unit

PCR: Polymerase Chain Reaction

SEM: Scanning Electron Microscopy

SSU rRNA: Small SubUnit ribosomal RNA

SSU rDNA: Small SubUnit ribosomal RNA gene

STXM: Scanning Transmission X-Ray Microscopy

TEM: Transmission Electron Microscopy

XANES: X-Ray Absorption Near Edge Spectroscopy

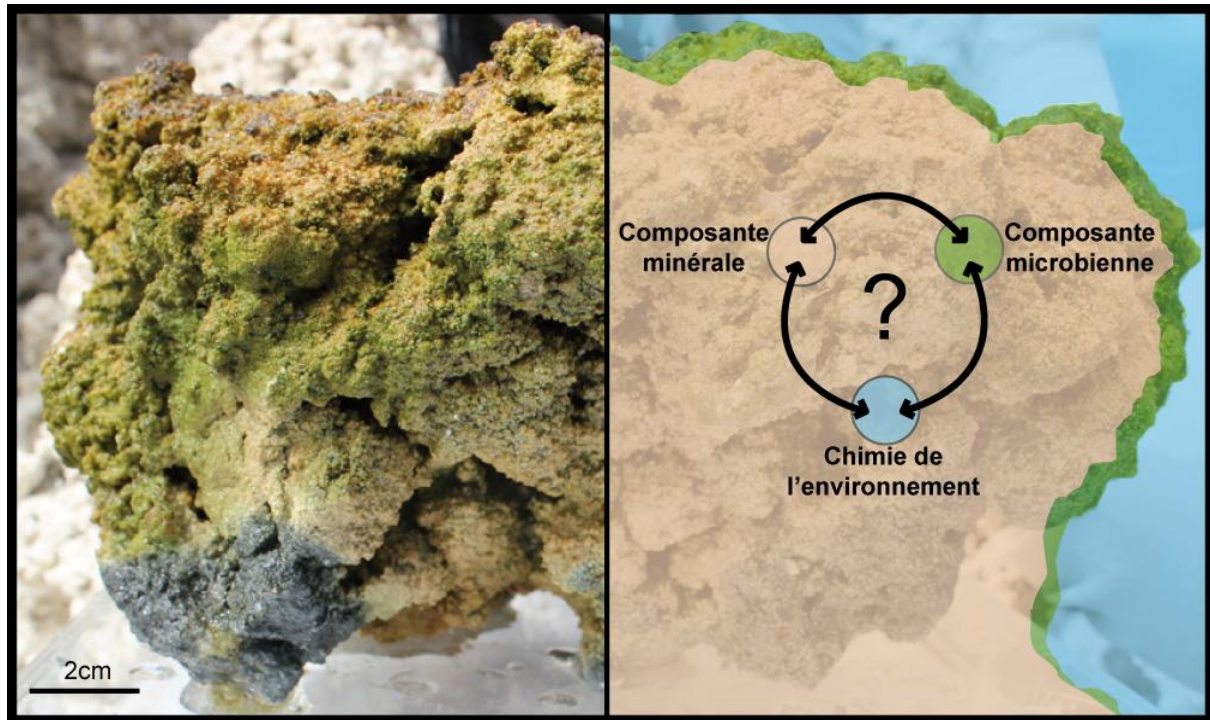


### Introduction

Le terme **stromatolite** a été introduit par Kalkowsky (1908) : il vient du grec *stroma* « ce qu'on étend » associé à *lithos* « la pierre » (*Riding 2000*). Ce terme fait référence à la double nature des stromatolites, formés d'une composante minérale à macrofabrique laminée et d'un tapis microbien qui la recouvre et y est imbriqué. Kalkowsky propose une définition qui implique une origine biogénique des stromatolites, c'est-à-dire formé par le vivant, or c'est là une question qui reste aujourd'hui encore problématique. Il existe des stromatolites modernes (en cours de formation) pour lesquels l'association entre la roche et les microorganismes est un fait observable et des stromatolites fossiles où seule la partie minérale a été préservée. De là naît une ambiguïté dans l'utilisation du terme stromatolite. Dans le registre géologique, c'est avant tout un terme descriptif qui fait référence à une roche sédimentaire le plus souvent de nature carbonatée, que l'on distingue des autres structures sédimentaires par le dépôt de couches sédimentaires qui ne sont pas parallèles au substrat et qui permettent une croissance en colonne de la structure. Le terme stromatolite est donc utilisé par différents auteurs de façon différente, pour qualifier une structure sédimentaire laminée et/ou d'origine microbienne (*Riding 1999*).

Le terme **microbialite** est un terme plus général, il comprend toutes les roches (*lithos*) laminées ou non, formées par l'intervention de microorganismes (*microbia*) dont les stromatolites ne sont qu'une des formes possibles (*Burne et al. 1987*) (**Figure 1**). On voit parfois se former conjointement, dans un même environnement, des microbialites présentant une macrofabrique différente mais de minéralogie identique. C'est notamment le cas aux Bahamas, où on trouve des stromatolites et des thrombolites, (des microbialites ne présentant pas de lamination mais une macrofabrique grumeleuse) (*Myshrall et al. 2010; Mobberley et al. 2011*). Un des problèmes importants est de comprendre les mécanismes de formation, à l'actuel, de ces roches (les microbialites) laminées ou non, afin de mieux interpréter l'enregistrement fossile.

## INTRODUCTION



**Figure 1 :** Photo d'un microbialite du lac alcalin d'Alchichica. La partie droite représente une coupe schématique du même microbialite. La formation d'un microbialite résulte de l'interaction complexe entre (i) une **composante microbienne** constituée d'un biofilm présentant une grande diversité de microorganismes, (ii) une **composante minérale**, le plus souvent un carbonate de calcium ou de magnésium et (iii) l'**environnement** qui l'entoure (pH, température, concentration en calcium...). La nature de ces composantes, de leurs interactions et leur contribution à l'édification du microbialite n'est pas connue. Ceci constitue la question centrale qui motive ce travail.

# I. Les stromatolites fossiles

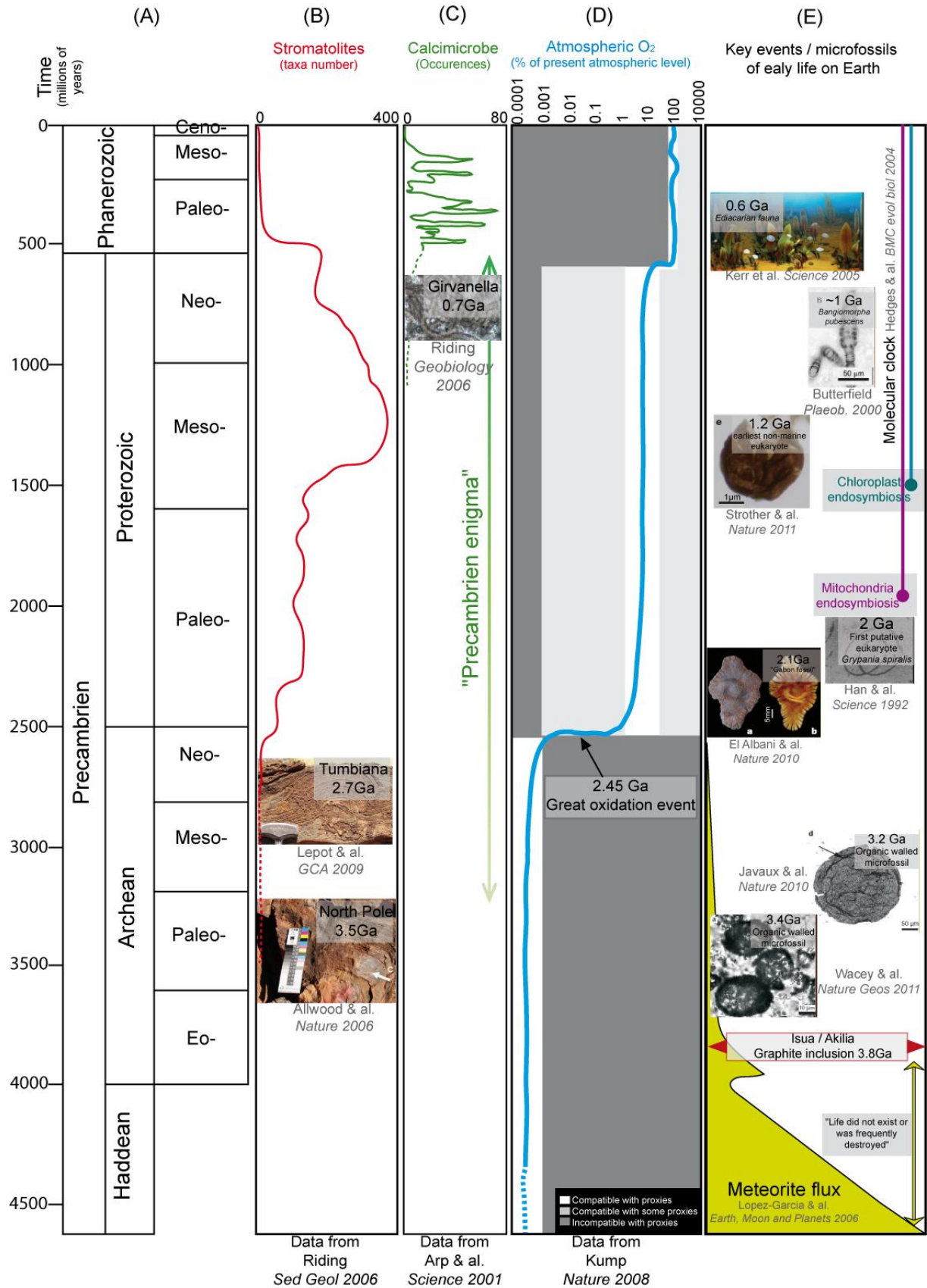
## A. Des vestiges des plus anciennes traces de vie terrestre ?

Il existe deux types d'enregistrement nous permettant d'accéder à l'origine et à l'évolution des être vivants. Le premier type est le signal enregistré par les caractères, par exemple la séquence des gènes dans les génomes des êtres vivants actuels à partir desquels il est possible de reconstruire idéalement des états ancestraux. Le second type est le signal enregistré dans le registre géologique par la présence de fossiles qui cette fois-ci est un signal direct. Dans les deux cas les données sont parcellaires, ce qui rend très difficile la reconstruction de l'histoire de la vie depuis son origine.

L'origine de la vie sur Terre est extrêmement difficile à dater pour plusieurs raisons. Tout d'abord il n'y a pas de signal que l'on puisse attribuer de manière sûre à cette époque dans les génomes des êtres vivants actuels car ils ont tous divergé à partir d'un ancêtre commun (LUCA, Last Universal Common Ancestor) lui-même postérieur à l'apparition de la vie (*Koonin et al. 2005*). Ensuite les terrains très anciens et qui affleurent sont rares et ils ont souvent été grandement transformés durant les milliards d'années suivant leur mise en place par la diagenèse et le métamorphisme (*Bernard et al. 2007; Bernard et al. 2010*). Enfin, la vie à ses débuts était sans doute peu abondante ; la probabilité qu'on en retrouve des traces est donc très faible. On pose un jalon inférieur pour l'apparition de la vie autour de 3,8 Ga qui correspond à la fin de l'épisode de bombardement météoritique intense, qui pour un certain nombre d'auteurs n'aurait pas autorisé l'implantation de la vie (*Chyba 1993*)(Figure 2). Dans ce contexte, la plus ancienne trace de vie présumée serait la présence d'inclusions carbonées retrouvées dans les roches sédimentaires d'Isua et d'Akilia (Groenland) à environ 3,8 Ga (*Mojzsis et al. 1996*). En effet cette matière organique présente une signature isotopique ( $\delta^{13}\text{C} < 0$ ) qui est classiquement interprétée comme caractéristique de la vie (*Mojzsis et al. 1996; Madigan et al. 2009*) ; néanmoins l'origine biogénique de ce carbone organique est très controversée. En effet, cette signature isotopique aurait pu également être obtenue de façon abiotique par décomposition de la sidérite en conditions métamorphiques (*Van Zuilen et al. 2003; Lepland et al. 2011*). Il faut ensuite attendre la date de 3,5 Ga pour trouver les traces de vie présumées suivantes : les stromatolites.



## INTRODUCTION



**Figure 2 :** Eléments de l'évolution de la bio-géosphère à travers les temps géologiques. De gauche à droite : **(A)** grandes divisions des temps géologiques, **(B)** variation de l'abondance des stromatolites exprimée en nombre de taxons (Riding 2006b) et illustration des stromatolites fossiles de NorthPole

## INTRODUCTION

(Allwood *et al.* 2006) et de Tumbiana (Lepot *et al.* 2009), **(C)** occurrences des calcimicrobes dans le registre géologique (Arp *et al.* 2001) et illustration du plus ancien calcimicrobe du genre *Girvanella* (Riding 2006a), **(D)** variation et contraintes sur le niveau de l'oxygénation de l'atmosphère (Kump 2008), **(E)** quelques éléments de l'évolution de la vie sur Terre incluant la période initiale de fort bombardement de météorites (Lopez-Garcia *et al.* 2006), quelques exemples clés de micro- (Han *et al.* 1992; Butterfield 2000; Javaux *et al.* 2010; Strother *et al.* 2011; Wacey *et al.* 2011) et macrofossiles (Kerr 2005; El Albani *et al.* 2010) et la calibration des endosymbioses de la mitochondrie et du chloroplaste par horloge moléculaire (Hedges *et al.* 2004).

### 1. Les stromatolites dans le registre fossile

Il est souvent avancé que les stromatolites fossiles comptent parmi les plus anciennes traces potentielles de vie sur Terre. Les plus anciens décrits se trouvent dans des terrains **Archéens** à l'ouest de l'Australie (formations North-Pole (Walter *et al.* 1980) (3,5 Ga-3,3 Ga) et Warrawoona (3,5 Ga-3,2 Ga) (Lowe 1980) du craton de Pilbara) et en Afrique du Sud (formation de la ceinture de roches vertes de Barberton (Byerly *et al.* 1986) 3,5 Ga-3,2 Ga) (Figure 2). Les stromatolites de ces formations ont été reconnus en utilisant des critères structuraux et texturaux par comparaison avec les traits caractéristiques de stromatolites plus récents tels que la présence de laminations, la forme, la présence ou non de ramifications et l'association relative des stromatolites et des couches sédimentaires adjacentes (Byerly *et al.* 1986; Hofmann *et al.* 1999). Néanmoins leur biogénicité reste une question controversée (Lowe 1994; McLoughlin *et al.* 2008). En effet, il semble que la démarche classique soit de considérer comme biogéniques uniquement les traits qu'on ne peut pas expliquer par des processus purement abiotiques, **l'hypothèse abiotique étant considérée comme l'hypothèse par défaut** (Grotzinger *et al.* 1996). Ainsi Lowe (1994) remet en cause l'origine biogénique de tous les stromatolites de plus de 3,2 Ga en proposant des alternatives abiotiques à leur formation : par exemple une déformation *a posteriori* des terrains ou une précipitation dans des fractures permettant de générer les morphologies observées. D'autres auteurs argumentent au contraire qu'au moins certains de ces stromatolites seraient d'origine biogénique : par exemple, dans le cas des stromatolites de North Pole, la morphologie macroscopique de ces stromatolites et la façon dont ils recoupent les formations alentours indiqueraient que leur accréation a eu lieu au dessus de l'interface sédiment-eau et qu'il n'y aurait pas eu de déformation postérieure (Walter *et al.* 1980). La formation de Pilbara qui s'étend sur des kilomètres carrés a été explorée, révélant 7 types morphologiques de stromatolites différents. La diversité et la complexité de leurs formes font dans ce cas également pencher les auteurs en faveur d'une origine biogénique pour ces structures (Allwood *et al.* 2006).

## INTRODUCTION

Ces controverses suggèrent que **les critères morphologiques seuls**, même s'ils peuvent être raffinés par des données stratigraphiques et des comparaisons avec des structures récentes **ne sont pas suffisants** pour conclure sur la nature biogénique ou abiotique des stromatolites, surtout sur des formations très anciennes qui ont pu être transformées.

Les plus anciens stromatolites décrits dont la biogénicité est généralement admise ont 2,7 Ga (Figure 2). On en a trouvé dans différents cratons Archéens, notamment celui de Pilbara (formation de Tumbiana, Fortescue group) (Arndt *et al.* 1991). A partir de cette date et jusqu'à la base du Cambrien, les stromatolites sont très fréquemment rencontrés dans le registre géologique sédimentaire. Ils forment des plates-formes carbonatées de taille kilométrique et de grande épaisseur et constituent ainsi un type **d'écosystème très répandu et diversifié dans la deuxième moitié du Précambrien** (Riding 2000).

A partir du Cambrien on observe un déclin des stromatolites ; parallèlement on assiste à une grande diversification des eucaryotes pluricellulaires en termes morphologiques (Figure 2). On considère par exemple que tous les plans d'organisation des phyla de métazoaires actuels ont été mis en place à cette période (Gould 1991; Lopez-Garcia *et al.* 2006; Donoghue *et al.* 2007). Certains auteurs proposent que cette explosion cambrienne et la colonisation des niches écologiques jusque là réservées aux stromatolites par des organismes plus compétitifs auraient accéléré leur déclin (Riding 2006b). En conséquence, on note un **changement dans la nature des carbonates biogéniques à partir du Cambrien** : alors qu'ils étaient auparavant de type procaryote, ils sont par la suite formés essentiellement par les eucaryotes. On note un grand développement des carbonates récifaux formés par les coraux (Riding 2006b) puis à partir du Crétacé la production majoritaire de carbonates est associée à la production de squelettes par différents types de protistes (tel que les nummulites au début du Tertiaire, les foraminifères et les coccolithophoridés toujours présents dans l'océan actuel) et de métazoaires (en particulier les mollusques tels que les rudistes qui s'éteignent à la crise Crétacé-Tertiaire) (Pomar *et al.* 2008).

S'ils ont **dominé l'histoire de la vie terrestre pendant près de 2 milliards** d'années, les stromatolites vivants sont désormais très **rare**s à la surface de la planète. Néanmoins les stromatolites fossiles constituent un enregistrement unique des conditions qui régnaient sur la Terre ancienne (Figure 2).

### 2. Implications pour notre compréhension de la Terre ancienne et de son évolution jusqu'à l'actuel

L'essentiel de la biomasse associée aux stromatolites modernes est constitué par les **cyanobactéries** qui sont des bactéries capables **de faire la photosynthèse oxygénique**. La photosynthèse oxygénique permet la synthèse de matière organique en ayant la lumière du soleil comme source d'énergie et l'eau comme source d'électrons. L'eau est oxydée en **dioxygène ( $O_2$ )** lors du processus. Or à l'actuel il s'avère que tous les organismes/organites (chloroplastes) capables de faire la photosynthèse oxygénique dérivent d'un **ancêtre commun unique de la lignée des cyanobactéries** (Zablen et al. 1975; Gupta et al. 2010). La photosynthèse oxygénique n'aurait donc évolué qu'une seule fois probablement à l'Archéen, dans la lignée des cyanobactéries (Falcon et al. 2010).

Il a été suggéré par de nombreux auteurs que la présence et l'abondance des stromatolites à partir de la fin de l'Archéen et au Protérozoïque représente un marqueur indirect de la présence et du développement des ancêtres de la lignée des cyanobactéries et de leur activité photosynthétique (Buick 1992; Buick 2008). Leur activité photosynthétique aurait **permis la production d'une grande quantité d' $O_2$**  qui *in fine* a conduit à **l'oxygénation de l'atmosphère il y a 2,45 Ga (Figure 2)**. On pense que l' $O_2$  produit a d'abord oxydé les composés/minéraux réduits dans l'océan avant de s'accumuler dans l'atmosphère dès 2,45 Ga (Kump et al. 2007; Kump 2008). Cet épisode qu'on appelle le Great Oxidation Event (GOE) est bien contraint grâce à des données géologiques (Farquhar et al. 2011) (Figure 2), et a considérablement modifié le fonctionnement géochimique de la surface de la Terre. En effet la disponibilité, la mobilité, et la réactivité des espèces chimiques changent en fonction de leur état d'oxydation. L'oxygénation de l'atmosphère a par exemple modifié profondément le cycle du soufre, en inhibant la formation d'aérosols sulfurés (Farquhar et al. 2011). S'en suit également un changement de la partie de la biosphère en contact avec l'atmosphère oxygénée, impliquant la sélection des métabolismes aérobies ou tolérant la présence d'oxygène (Raymond et al. 2006). Il a été proposé que le niveau actuel d'oxygène a été atteint à la base du Cambrien (Kump 2008).

Les microorganismes qui peuplaient les stromatolites anciens ont également influencé d'autres cycles géochimiques majeurs. Tout d'abord celui du carbone par le piégeage du  $CO_2$  dans la matière organique grâce à la photosynthèse. Ensuite le cycle de l'azote. On pense que la fixation de l'azote atmosphérique ( $N_2$ ) est apparue dès l'Archéen (Falcon et al. 2010);

## INTRODUCTION

c'est seulement après le GOE que les métabolismes, tels que la nitrification/dénitrification et l'anammox, faisant intervenir des formes plus oxydées ( $\text{NO}^{2-}$ ,  $\text{NO}^{3-}$ ), auraient été sélectionnés (*Farquhar et al. 2011*).

**Il apparaît clairement que l'interprétation biogénique des stromatolites fossiles conditionne notre compréhension de la Terre ancienne et de son évolution. En effet les microorganismes associés aux stromatolites anciens ont sans doute modifié de façon majeure les cycles géochimiques globaux du carbone, de l'oxygène, de l'azote et du soufre, jouant ainsi un rôle primordial dans l'évolution du couple atmosphère-océan et de la biosphère. Il apparaît donc essentiel de contraindre au maximum les critères d'interprétation des fossiles afin d'exploiter de la manière la plus vraisemblable et la plus exacte leurs implications pour l'évolution de la Terre depuis 3,5 Ga.**

### **B. Les microfossiles**

A priori un bon critère pour prouver la biogénicité des stromatolites anciens serait d'y trouver des **fossiles des microorganismes** (microfossiles) qui les ont formés. Cette approche déplace le problème de la reconnaissance et de l'interprétation des stromatolites à celles des microfossiles. De plus ce n'est pas parce qu'on trouve un fossile, qu'il a contribué à former la roche qui l'entoure. Ainsi l'identification de microfossiles dans les stromatolites constituera au plus un argument en faveur de la biogénicité mais pas une preuve absolue.

#### **1. La controverse historique des « microfossiles de Schopf »**

En 1987, Schopf & Packer décrivent des microfossiles dans les sédiments de Warrawoona (Pilbara, Australie) datés de 3,5 Ga (*Schopf et al. 1987*). La forme filamenteuse, la taille micrométrique et la nature carbonée de ces structures a été interprétée par ces auteurs comme des **microfossiles de cyanobactéries**. Par la suite des **données isotopiques et des analyses morphologiques** plus poussées ont mené Schopf *et al.* à réaffirmer l'origine biologique des microfossiles et à les répartir en 8 taxons de cyanobactéries fossiles auxquels il donne des noms (*Schopf 1993; Schopf et al. 2002*). Cependant il a été montré par la suite que l'environnement de dépôt des roches en question était **de type hydrothermal profond**, ce qui n'est pas compatible avec la présence de cyanobactéries, et que les morphotypes des microfossiles étaient plus divers que ceux décrits par Schopf *et al.*, certains n'étant pas « biocompatibles » (*Brasier et al. 2002; Brasier et al. 2005; Brasier et al. 2006*). L'origine de

## INTRODUCTION

la matière organique a elle aussi été remise en question : elle aurait en effet pu être formée de façon abiotique par les **réactions de Fisher Tropsch** (*Lindsay et al. 2005*) ; enfin récemment, il a été montré que cette même matière organique n'est en réalité pas associée aux microfossiles mais dispersée dans la matrice de quartz autour, les microfossiles étant eux constitués essentiellement d'hématite (*Marshall et al. 2011*). Cependant, l'histoire ne s'arrête pas là, puisque visiblement *Marshall et al.* n'ont pas examiné les mêmes spécimens que ceux étudiés par *Schopf et al.*, ce qui remet en doute leurs conclusions (*Schopf et al. 2011*). De plus, des microfossiles ont de nouveau été décrits dans les roches de 3,4 Ga de Pilbara (Australie) (*Wacey et al. 2011*) ainsi que dans des roches d'Afrique du sud de 3,2 Ga (*Javaux et al. 2010*) (**Figure 2**). Ces microfossiles, pour certains d'assez grande taille ( $>10\ \mu\text{m}$ ), présentent une enveloppe carbonée et dans le cas de Pilbara sont associés à de la pyrite (*Wacey et al. 2011*) que les auteurs interprètent comme un résultat du métabolisme des cellules en question.

Cette controverse sur l'existence ou non de microfossiles dans les roches de Pilbara et sur leur appartenance à des lignées biologiques particulières dure depuis plus de 20 ans et illustre la **difficulté d'authentifier les microfossiles** anciens. Il est donc nécessaire de comprendre comment se forment les microfossiles et quels sont les critères qui peuvent être retenus pour authentifier leur origine.

### 2. Des critères pour la biogénicité ?

Avant d'essayer d'authentifier un microfossile il faut être capable de le voir, il faut donc qu'il ait été préservé en conservant une morphologie cohérente par rapport à celle des cellules vivantes à l'actuel. On va donc chercher à distinguer **des inclusions de taille micrométrique, sphériques, plus ou moins filamenteuses ou ramifiées dans la roche**. Cependant le critère morphologique ne suffit pas, puisqu'il a été montré expérimentalement que l'on pouvait obtenir ce type de structures par des **processus abiotiques** (*Garcia-Ruiz et al. 2002*; *Garcia-Ruiz et al. 2003*). On peut ensuite s'intéresser à la nature de l'inclusion ; la spectroscopie Raman, par exemple, peut aider à savoir si elle contient du carbone organique et si c'est le cas on peut caractériser cette matière organique grâce aux outils isotopiques. Mais encore une fois, **même si l'on trouve du carbone organique appauvri en  $^{13}\text{C}$ , cela ne permet pas de conclure sur la biogénicité** puisqu'il existe des phénomènes abiotiques qui peuvent mener à la formation de ce type de matière organique (*Nagy et al. 1975*; *Lindsay et al. 2005*). Enfin il est souvent difficile de savoir si la matière organique observée est **indigène** et a été mise en



## INTRODUCTION

place en même temps que la roche ou si elle a été apportée ultérieurement (*Gerard et al. 2009*). Il est cependant possible d'estimer la température maximale atteinte par la matière organique par spectro-thermométrie Raman (*Beyssac et al. 2002*) et ainsi de savoir si celle-ci est cohérente avec celle de la roche estimée grâce à l'association minéralogique.

La définition de critères pour la biogénicité est toujours basée sur ce que l'on connaît de la vie présente (selon le principe de l'**actualisme**) ; or, à l'actuel, il est possible de décrire les mécanismes de formation. Cette démarche plus systémique n'a été menée sur les microbialites modernes que rarement car elle demande la mise en œuvre de nombreux outils différents. Or la compréhension de ces mécanismes et des détails de leurs étapes donnerait un cadre idéal pour l'interprétation des stromatolites. Il faudrait alors prendre en compte également le devenir de ces traces fossiles si on les soumet à des variations de pression et de température en y ajoutant les filtres de diagénèse et de métamorphisme.

### 3. Les « calcimicrobes » et l'énigme précambrienne

Un type de microfossile particulièrement pertinent quand on s'intéresse aux stromatolites sont les « calcimicrobes », c'est-à-dire des **microfossiles de cyanobactéries calcifiées** (*Riding 2006a*). En effet les cyanobactéries forment l'essentiel de la biomasse associée aux stromatolites actuels (e.g. *Foster et al. 2009; Kaźmierczak et al. 2011*) ; de plus, ce sont des cellules bactériennes de grandes tailles avec des morphologies variées (*Rippka 1988*) que l'on peut espérer pouvoir reconnaître dans les stromatolites si elles se fossilisent. Le plus ancien fossile avéré de cyanobactérie calcifiée date de **700 Ma** (*Knoll et al. 1993*)(**Figure 2**). Il s'agit du morphotype filamenteux *Girvanella*. Cependant il faut attendre la base du Cambrien pour trouver de façon fréquente des « calcimicrobes » (*Riding 2006a*). Un fait étonnant est que les « calcimicrobes » apparaissent dans le registre géologique seulement à la fin du Néoprotérozoïque alors que les cyanobactéries étaient déjà présentes depuis deux milliards d'années environ et avaient permis notamment l'oxygénation de l'atmosphère à 2,45 Ga (*Farquhar et al. 2011*). **L'absence de cyanobactéries fossiles avant 700 Ma qui correspond pourtant à l'âge d'or des stromatolites est appelée l'énigme précambrienne** (*Riding 1982; Arp et al. 2001*) (**Figure 2**). Deux hypothèses ont été avancées pour essayer de lever ce paradoxe, en extrapolant les connaissances et données actuelles sur les cyanobactéries. La première présente l'idée que **la chimie des océans anciens n'était pas compatible avec la calcification** des cyanobactéries. La précipitation de carbonates à proximité de la

## INTRODUCTION

cyanobactérie n'intervient que si la concentration de  $\text{Ca}^{2+}$  est élevée, et elle doit l'être d'autant plus que le DIC (Dissolved Inorganic Carbon) est élevé, c'est-à-dire que la pression atmosphérique en  $\text{CO}_2$  est forte. Or la pression atmosphérique de  $\text{CO}_2$  était plus forte dans le passé et la concentration de calcium était insuffisante pour permettre la calcification des cyanobactéries avant la base du Cambrien. On avait donc une faible concentration en calcium et un fort DIC ce qui favorise la précipitation loin de la bactérie. L'alcalinité produite par les cellules du fait de l'activité photosynthétique n'est pas suffisante dans ces conditions pour mettre en place un gradient de pH qui induirait la précipitation au contact de la cellule (*Arp et al. 2001*). La seconde hypothèse invoque **un facteur biologique** : il est connu qu'à l'actuel toutes les cyanobactéries ne calcifient pas (*Planavsky et al. 2009*) ; cela pourrait être lié à des **différences chimiques des exopolymères** qu'elles produisent et qui sont le lieu de nucléation des carbonates (*Dupraz et al. 2005; Obst et al. 2009*) ou encore des différences métaboliques. En effet le mécanisme qui génère l'alcalinité à proximité des cyanobactéries est lié aux **mécanismes de concentration du carbone (CCM)**. Ceux-ci comprennent différents transporteurs et des enzymes de conversion des formes dissoutes du carbone. Par exemple, l'activité de **l'anhydrase carbonique** permet d'augmenter la concentration de  $\text{CO}_2$  dans le carboxysome, c'est-à-dire à proximité de la RuBisCO (Ribulose 1,5 biphosphate carboxylase oxygenase). En effet, l'anhydrase carbonique convertit les ions  $\text{HCO}_3^-$  en  $\text{CO}_2$  et libère un ion  $\text{OH}^-$  ; celui-ci est alors exporté et augmente localement le pH à proximité de la cellule (*Jansson et al. 2010*). Or le type d'anhydrase carbonique et son activité dépendent du groupe de cyanobactérie (*Pronina et al. 2007*). De plus certains auteurs proposent que les mécanismes de concentration du carbone ont été sélectionnés en réponse à la diminution de la pression atmosphérique en  $\text{CO}_2$  au cours des temps géologiques ; en effet les CCM permettent que la RuBisCO effectue sa fonction de carboxylase même si la pression partielle en  $\text{CO}_2$  à l'extérieur ne le permet pas (*Altermann 2006; Riding 2006a*).

L'énigme précambrienne n'est pas résolue, des éléments nouveaux relatifs à cette question seront présentés dans le chapitre 3 de ce manuscrit. Sa compréhension passera sans doute également par de nouvelles observations des stromatolites fossiles avec des techniques plus avancées de caractérisation qui permettent de décrire les objets jusqu'à la nano-échelle mais également des observations et des expérimentations sur les analogues modernes. En effet, il sera important de mieux caractériser les mécanismes de calcification existant dans la diversité du vivant (un exemple de ce type d'étude sera développé dans le chapitre 2). Ceci pourrait permettre de définir les éléments biochimiques, minéralogiques et texturaux à aller chercher



## INTRODUCTION

dans les stromatolites fossiles afin d'authentifier les microfossiles et de leur assigner un mécanisme de formation. Ces renseignements sont précieux pour reconstruire les conditions du milieu environnant les cellules lors de leur fossilisation. Enfin une meilleure compréhension du rôle des cyanobactéries dans la précipitation des carbonates à l'actuel pourrait permettre d'estimer leur contribution réelle à l'édification des stromatolites. En effet il a été montré dans le lac Walker (Nevada), que la croissance des stromatolites ne dépendait pas de l'orientation de ceux-ci vis-à-vis du soleil et donc que le moteur principal de cette croissance ne pouvait sans doute pas être lié à l'activité photosynthétique (*Petryshyn et al. 2011*). La part relative des processus biotiques et abiotiques dans la précipitation des carbonates de calcium/magnésium reste donc à évaluer. Et cela ne pourra sans doute être fait que par la mise en œuvre d'expériences de précipitation en conditions semi-contrôlées dans des analogues actuels.

### C. Les biosignatures

Si l'identification directe des microorganismes fossiles reste délicate comme nous venons de le voir, elle peut-être couplée à l'analyse de biosignatures, c'est-à-dire de traces (autres que la morphologie) de la présence des microorganismes.

#### 1. L'ADN ancien

L'ADN sert à caractériser la diversité des microorganismes actuels par le biais de la comparaison des séquences nucléotidiques des gènes plus ou moins conservés. De plus, il s'agit d'un polymère d'origine biogénique. Ce serait donc *a priori* une molécule de choix à rechercher dans les échantillons anciens pour les comparer aux modernes. Cette approche présente cependant deux problèmes majeurs : le premier est la **préservation de la molécule d'ADN** dans le temps et le second est la forte probabilité de **contamination postérieure** par de l'ADN exogène. Il existe des protocoles très stricts pour s'affranchir du problème des contaminations introduites lors de la manipulation par les chercheurs. Ils impliquent notamment un réplikat indépendant dans un autre laboratoire pour confirmer que l'ADN extrait et séquencé provient bien de l'échantillon. En suivant ce protocole, de l'ADN a été obtenu à partir d'échantillons de 1 million d'années, mais pas au delà (*Willerslev et al. 2005*). En effet lors de la lyse cellulaire la molécule d'ADN est en général hydrolysée par les nucléases de la cellule. Dans de rares cas (déshydratation précoce ou adsorption sur une surface minérale) la molécule d'ADN pourra être préservée, mais elle sera dégradée au cours

## INTRODUCTION

du temps par des attaques chimiques du même ordre que celles qui ont lieu *in vivo* (attaque hydrolytique, oxydante, rupture de brin...) mais sans réparation possible (Paabo *et al.* 2004). Le temps caractéristique de préservation de l'ADN n'est donc pas compatible avec les questions relatives aux stromatolites fossiles qui se comptent en centaines de millions voire en milliards d'années. Ce type d'approche a pour l'instant été utilisé avec succès uniquement sur des métazoaires, à partir de tissus pluricellulaires et même ainsi la biomasse recueillie est souvent faible (Willerslev *et al.* 2005). Essayer d'extraire de l'ADN ancien sur des organismes unicellulaires représente un vrai challenge ; ceci a été tenté sur des microfossiles de cyanobactéries (Panieri *et al.* 2010) dans des formations de gypse de 6 Ma. Les auteurs ont réussi à extraire de l'ADN et à obtenir 11 séquences interprétées comme des cyanobactéries marines. Cette étude révèle que l'approche ADN ancien peut fournir des résultats dans des échantillons relativement jeunes, malgré les difficultés très importantes liées aux problèmes de contamination plus tardive. Cependant ce genre de résultat est à considérer avec précaution car même si les résultats sont cohérents avec ce que l'on attend, il est impossible de savoir si l'ADN ne provenait pas d'une communauté postérieure à la formation de la roche (Gerard *et al.* 2009). Il serait intéressant dans ce cadre de suivre l'évolution de l'ADN lors de la fossilisation de cyanobactéries modernes, afin de voir si la molécule peut être préservée et dans quelles conditions.

### 2. Les lipides (biomarqueur s.s.)

L'utilisation des lipides comme biomarqueurs vient de l'observation que certains groupes de microorganismes actuels produisent **certains types de lipides spécifiques**. Par exemple les stéranes, dérivés des stérols, révéleraient la présence des eucaryotes (Brocks *et al.* 2003). Le principe de cette approche est l'extraction en masse des lipides à partir d'un échantillon de roche puis leur caractérisation par chromatographie et spectrométrie de masse (Brocks *et al.* 2003). Le premier problème est que l'utilisation de ce type de biomarqueur dans les roches anciennes se fonde sur l'hypothèse que les ancêtres des êtres vivants actuels qui vivaient il y a des milliards d'années avaient les mêmes spécificités métaboliques qu'actuellement. De plus la **spécificité** que l'on attribue aux marqueurs est limitée par notre niveau de connaissance. Par exemple il a été montré que le 2-méthylhopanoïde utilisé pour diagnostiquer la présence de cyanobactéries (Summons *et al.* 1999) était en fait également produit par une alphaprotéobactérie (Rashby *et al.* 2007). De même les stéroïdes ne sont pas produits uniquement par les eucaryotes mais aussi par les myxobactéries (appartenant aux delta-protéobactéries)(Bode *et al.* 2003) et la détection de stéranes ne peut donc être utilisée comme

## INTRODUCTION

la signature univoque des eucaryotes. Le second problème de ce type d'analyse est qu'elle doit être réalisée sur la matière organique d'origine ; or il peut y avoir **diverses sources de contaminations**, par des microorganismes qui se sont installés postérieurement ou lors de l'expérimentation (*Gerard et al. 2009*). Ce problème a par exemple mené à une mauvaise interprétation des lipides retrouvés dans les roches de Pilbara (2,7 Ga). En effet ils suggéraient la présence d'eucaryotes il y a 2,7 Ga, soit près d'un milliard d'années avant la date supposée de leur apparition (*Brocks et al. 1999*). Il a été ensuite montré que les lipides détectés n'étaient pas indigènes et provenaient vraisemblablement d'une contamination postérieure (*Rasmussen et al. 2008*). Les lipides des stromatolites modernes des Bahamas ont été étudiés, mais il s'avère que cette approche ne permet pas d'aboutir à une meilleure résolution dans la caractérisation des populations microbiennes par rapport aux techniques classiques d'analyse de diversité microbienne par méthode moléculaire ; car il est difficile même sur des exemples modernes bien caractérisés par ailleurs (*Burns et al. 2004; Allen et al. 2009*) d'affilier les microorganismes en fonction des lipides qu'ils produisent (*Allen et al. 2010*). En résumé, pour utiliser les lipides comme biomarqueurs, il faut : (i) connaître parfaitement le spectre de lipides produit par les organismes actuels (ii) s'affranchir des problèmes de contamination en faisant par exemple le même type d'analyses *in situ* à micro-échelle ce qui n'est pas encore possible techniquement.

### 3. Les isotopes du carbone

Il existe deux isotopes stables du carbone, le  $^{12}\text{C}$  et le  $^{13}\text{C}$ . Certaines enzymes du métabolisme des êtres vivants fractionnent ces deux isotopes c'est-à-dire qu'elles utilisent préférentiellement un isotope plutôt que l'autre et que par conséquent le ratio  $^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$  est différent dans le substrat et dans le produit de l'enzyme. Par exemple, la RuBisCO, qui est la première enzyme du cycle de Calvin, fixe préférentiellement le  $^{12}\text{C}$  par rapport au  $^{13}\text{C}$ , car le  $^{12}\text{C}$  plus léger se déplace plus rapidement et rencontre le site actif de l'enzyme avec une plus grande probabilité. Ainsi, la photosynthèse va produire une matière organique relativement appauvrie en  $^{13}\text{C}$ , soit avec un  $\delta^{13}\text{C}$  inférieur à zéro, autour de -25‰ (*Thomazo et al. 2009*). Le signal isotopique peut donc être un bon traceur de l'origine du carbone, et il a été largement utilisé dans les roches anciennes arguant pour une origine biogénique de la matière organique observée à partir de 3,5 Ga (*Schidlowski 2001; Thomazo et al. 2009*). Cependant le fractionnement isotopique peut être secondairement effacé par rééquilibrage des isotopes, par exemple par diffusion ou lors de la circulation de fluides hydrothermaux (*Schidlowski 2001; Van Zuilen et al. 2003*). De façon intéressante, dans le cas des stromatolites il a été observé à

## INTRODUCTION

plusieurs reprises une association entre matière organique appauvrie en  $^{13}\text{C}$  et carbonate enrichi en  $^{13}\text{C}$ , ce qui serait alors un double marqueur de la photosynthèse. En effet si les cellules fixent préférentiellement le  $^{12}\text{C}$ , alors localement la précipitation du carbonate se fera dans un environnement enrichi en  $^{13}\text{C}$  (*Andres et al. 2006b; Breitbart et al. 2009; Planavsky et al. 2009; Brady et al. 2010*). La persistance de ce signal et sa valeur informative restent à explorer dans des stromatolites plus anciens.

### 4. Les marqueurs minéralogiques

Les marqueurs minéralogiques sont les minéraux formés ou transformés spécifiquement par le vivant. Ce sont a priori de bons marqueurs car ils ont plus de chance d'être préservés que les molécules d'origine biologique. Les êtres vivants produisent une très grande diversité de minéraux (*Hazen et al. 2008*). Néanmoins, tous ces minéraux (sauf peut-être la hazenite (*Yang et al. 2011*)) peuvent également se former non-associés au vivant si la chimie du milieu le permet. Ce n'est donc en aucun cas la nature du minéral formé qui pourra être utilisée comme critère de biogénicité. Les biominéraux formés par les êtres vivants possédant un squelette permettent de suivre avec une assez bonne résolution temporelle au Phanérozoïque l'évolution des groupes d'eucaryotes qui les produisent (*Pomar et al. 2008*). Dans le cas des stromatolites, les carbonates formés sont d'origine microbienne, et les occurrences de « calcimicrobes » sont presque absentes avant 0,6 Ma. Cependant des analyses à micro- ou nano-échelle ont mis à jour des éléments minéralogiques intéressants. Par exemple en 2008, *Lepot et al. (2008)* décrit des nano-cristaux d'aragonite ( $\text{CaCO}_3$ ) associés à des globules organiques dans les stromatolites de Tumbiana (2,7 Ga) (*Lepot et al. 2008*). Il a été proposé que la composition chimique de l'océan à cette époque a pu favoriser la précipitation de l'aragonite par rapport à la calcite, en relation avec la concentration élevée de magnésium dans le milieu (*Hardie 2003*), sans avoir besoin d'invoquer un rôle du vivant. La présence d'aragonite n'est donc pas un biomarqueur univoque mais un argument supplémentaire en faveur de la biogénicité dans ce cas puisqu'on la trouve sous forme de nano-phase associée à la matière organique, deux traits que l'on retrouve dans les stromatolites actuels (*Benzerara et al. 2006*).

Les études à cette échelle (inférieure au micromètre) restent assez rares dans les roches anciennes, pourtant ce sont elles qui sont pertinentes puisqu'on regarde des carbonates microbiens formés par des organismes dont la taille caractéristique est le micromètre. Ainsi il

## INTRODUCTION

reste sans doute beaucoup à découvrir dans ce domaine, en regardant la nature et la texture des phases minérales à fine échelle.

L'étude des stromatolites fossiles montre qu'il n'existe pas de critère absolu prouvant la biogénicité d'un stromatolite. C'est l'utilisation d'un faisceau concordant d'arguments qui permet aux auteurs de pencher en faveur de cette hypothèse plutôt que de celle d'une formation abiotique.

## II. Les microbialites actuels

Comme nous venons de le voir, si les stromatolites ont été très répandus dans les écosystèmes précambriens, ils sont désormais rares à la surface de la Terre. Dans cette partie, nous allons examiner les microbialites modernes de types carbonatés pouvant constituer *a priori* de bons analogues pour les stromatolites fossiles. On trouve des microbialites modernes aussi bien en eau de mer qu'en eau douce, dans des environnements hypersalés et/ou hyperalcalins (Table 1).

Les plus célèbres sont les stromatolites marins de Shark Bay en Australie, car ils ont été décrits en premier et que c'est grâce à leur description que le lien avec les fossiles a été initialement fait (Logan 1961; Reid et al. 2003; Burns et al. 2004). Les microbialites modernes sur lesquels on a le plus de données et qui ont été le mieux décrits sont sans conteste les stromatolites des Bahamas (Riding et al. 1991; Andres et al. 2006a). Un laboratoire temporaire a été installé plusieurs années sur la plage afin de suivre de façon quotidienne leur développement (Reid et al. 2000b). Parallèlement les données sur les microbialites lacustres sont assez dispersées ; on en a décrit à plusieurs endroits mais souvent avec des protocoles et des questions différentes.

## INTRODUCTION

Localité		Type de structure	Environnement		Minéralogie	Références
<b>Alchichica lake</b>	Mexique	microbialite	Lac alcalin	pH 8,9 Mg/Ca=40	Hydromagnesite Aragonite	(Kazmierczak et al. 2011)
<b>Clifton lake</b>	Australie	microbialite	Lac côtier salin	Moins salé que l'eau de mer	Aragonite	(Moore 1987; Wacey et al. 2010)
<b>Clinton Creek, Yukon</b>	Canada	microbialite	Mare, ancienne mine d'amiante	pH 8,4 Mg/Ca=4	Aragonite	(Power et al. 2011)
<b>Cuatro Ciénegas</b>	Mexique	thrombolite/ oncolite	Mare Eau douce	pH 7,5 – 8,1	Calcite	(Garcia-Pichel et al. 2004; Desnues et al. 2008; Breitbart et al. 2009)
<b>Eleuthera Island</b>	Bahamas	microbialites (mat calcifiant)	Lac hypersalé	70-150 PSU	High Mg-calcite	(Dupraz et al. 2004; Baumgartner et al. 2009a)
<b>Highborne Cay</b>	Bahamas	stromatolite/ thrombolite	Marin, peu profond	Eau de mer	Sédiments marin détritique et aragonite	(Visscher et al. 1998; Reid et al. 2000b; Decho et al. 2005; Andres et al. 2006a; Baumgartner et al. 2009b; Mobberley et al. 2011)
<b>Lagoa Vermelha</b>	Brésil	stromatolite	Lagon côtier	Eau saumâtre à hypersalé	High Mg-calcite et Ca-dolomite	(Spadafora et al. 2010)
<b>Laguna Bacalar</b>	Mexique	trombolite/ oncolite	Eau douce	Mg/Ca=4	Calcite	(Gischler et al. 2008)
<b>Manito Lake</b>	Canada	microbialite	Na-SO <sub>4</sub> lac hypersalé, hyperalcalin	pH 9,9 Mg/Ca=38	Dolomite et aragonite	(Last et al. 2010)
<b>Niufo'ou Island caldera</b>	Tonga	stromatolite	Lacs alcalins	pH 8 Mg/Ca=30	Aragonite et Silice	(Kazmierczak et al. 2006)
<b>Pavilion Lake</b>	Canada	stromatolite	Lac eau douce	pH=8	Calcite	(Laval et al. 2000)
<b>Pyramid Lake</b>	Nevada, USA	microbialite	Lac alcalin et apports hydrothermaux	pH 8-9 Mg/Ca=12	Carbonate	(Arp et al. 1999b)
<b>Ruidera Pool</b>	Espagne	stromatolite	Lacs	pH 7,8 Mg/Ca=0,5	Calcite	(Souza-Egipsy et al. 2006; Santos et al. 2010)
<b>Salda Gölü</b>	Turquie	stromatolite	Lac hyperalcalin	pH>9 Mg/Ca=60	Hydromagnesite	(Braithwaite et al. 1994; Braithwaite et al. 1996)
<b>Satonda</b>	Indonésie	microbialite	Lac alcalin	pH 8,6	Aragonite et	(Kempe et al. 1990; Arp

## INTRODUCTION

Lake			Mg/Ca=10	couches de Mg-Si	<i>et al. 2004)</i>
<b>Shark Bay</b>	Australie	stromatolite	Lagon, hypersalé semi-ouvert sur l'océan	Sédiments marin détritique et aragonite	<i>(Logan 1961; Papineau et al. 2005; Allen et al. 2009; Goh et al. 2009)</i>
<b>Lake Van</b>	Turquie	microbialite	Lac hyperalcalin pH>9,7	Aragonite et Mg-calcite	<i>(Kempe et al. 1991; Lopez-Garcia et al. 2005)</i>
<b>Walker Lake</b>	Nevada, USA	stromatolite	Lake alcalin (sodium-carbonate lake) pH 9,4	Ccalcite	<i>(Osborne et al. 1982; Petryshyn et al. 2011)</i>

**Table 1** : Origine géographique, environnement de dépôt et minéralogie des microbialites décrits dans la bibliographie. PSU : practical salinity units

### A. Composante microbienne des microbialites

L'intérêt majeur d'étudier les microbialites modernes est que l'association entre la partie minérale et le vivant est factuelle. On peut ainsi décrire les microorganismes, les observer et tester leur rôle dans la formation des microbialites.

#### 1. Présentation de la diversité des microorganismes

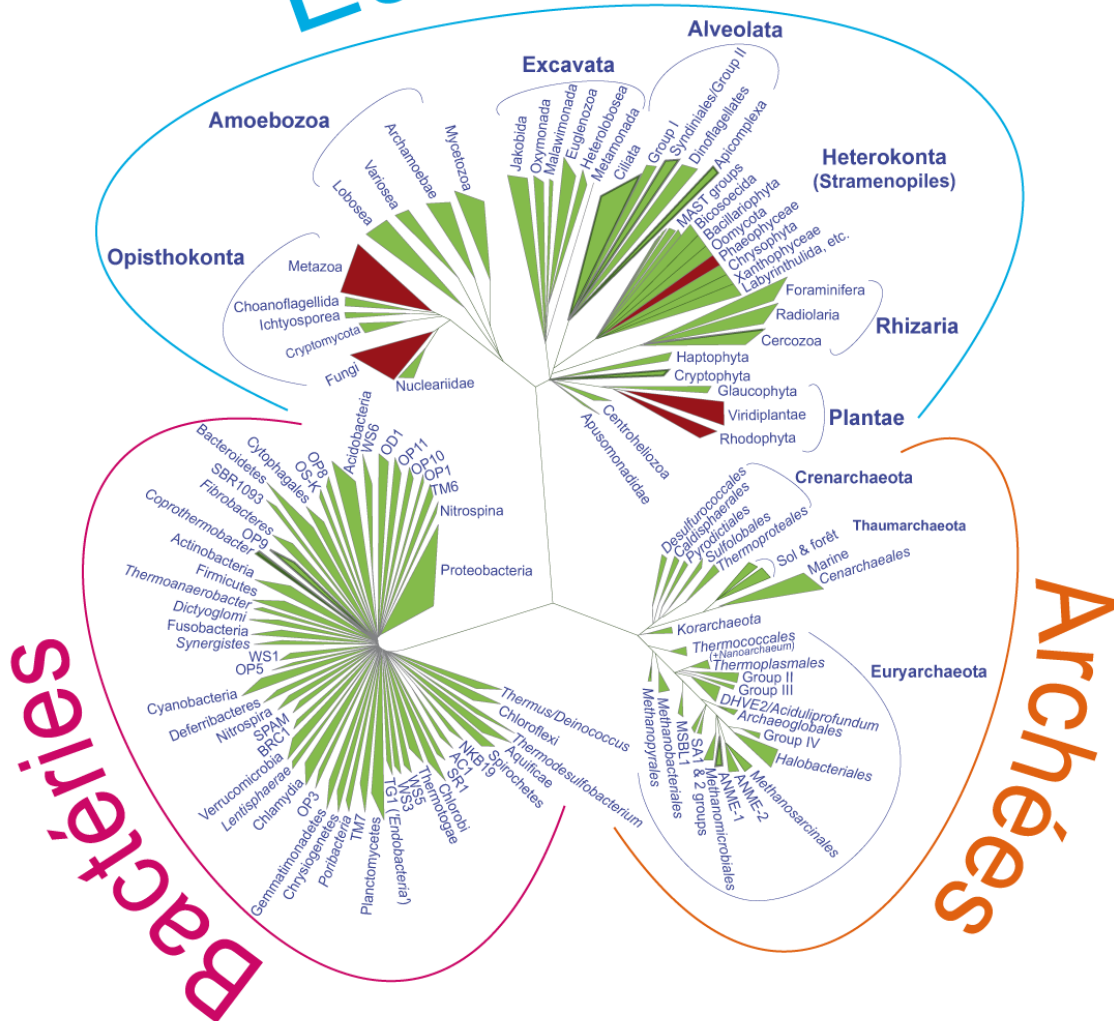
##### a) Comment accéder à la diversité des bactéries, archées et protistes ?

On sait depuis la fin des années 70 que le vivant est constitué **de trois domaines** d'organismes : **les bactéries, les archées et les eucaryotes** (*Woese et al. 1978; Woese et al. 1990*). Les archées et les bactéries comportent uniquement des phylums d'organismes unicellulaires. La plupart des eucaryotes sont également unicellulaires, à l'exception des phylums qui comportent aussi des organismes pluricellulaires avec des tissus ou pseudo-tissus plus ou moins complexes (Metazoa, Fungi, Phaeophyceae, Viridiplantae et Rhodophyta). Les protistes font référence aux eucaryotes unicellulaires au sens large (*Adl et al. 2005*) (**Figure 3**). Malgré leur diversité, tous les êtres vivants possèdent les mêmes bases biochimiques et le même code génétique, ce qui permet d'affirmer qu'ils descendent d'un même ancêtre commun (LUCA). Ils partagent en particulier le système de support de l'information héréditaire (l'ADN) et une partie de la machinerie d'expression de cette information dont le ribosome (*Bashan et al. 2008*). Le ribosome, alliage de protéine et d'ARN, est constitué d'une grande et d'une petite sous-unité. C'est dans la petite sous-unité qu'on trouve le SSU rRNA (small

## INTRODUCTION

subunit ribosomal RNA). Le **SSU rDNA** est le gène qui code pour le SSU rRNA. Ce gène est présent et très conservé chez tous les êtres vivants ; cela en fait un **marqueur universel** qui permet de comparer tous les êtres vivants entre eux (*Woese 1987*). Chaque position de la séquence de ce gène peut être considérée comme un caractère qui peut être comparé à ses homologues pour obtenir de l'information évolutive. En comparant les séquences, on peut donc savoir quelles sont celles qui se ressemblent le plus (qui partagent le plus de caractères identiques) c'est-à-dire qui ont divergé le plus récemment. De proche en proche on place ainsi les séquences les unes par rapport aux autres et on reconstruit **l'histoire du gène par phylogénie moléculaire**. Comme le SSU rDNA est très conservé et a une fonction majeure pour la cellule, on utilise **l'histoire de ce gène comme proxy pour l'histoire des organismes entiers et de leurs liens de parenté**.





En pratique, ce gène est spécifiquement amplifié par PCR (polymerase chain reaction) à partir de l'ADN de toute la communauté microbienne en utilisant des amorces qui ciblent un groupe plus ou moins étendu d'organismes. On peut par exemple utiliser des amorces dessinées pour amplifier toutes les séquences bactériennes ou uniquement une partie des bactéries, comme les cyanobactéries. Ensuite il existe plusieurs stratégies pour séquencer les produits amplifiés par PCR.

## INTRODUCTION

L'utilisation du SSU rDNA pour décrire et affilier les organismes vivants sans avoir besoin de les observer, de les cultiver ou de les isoler a permis de révéler une diversité insoupçonnée, en particulier au niveau des organismes unicellulaires (*Pace 1997*). En effet, on estime qu'environ 1% seulement des microorganismes sont cultivables (*Rappe et al. 2003*). L'étape de la **culture reste cependant une étape utile** pour étudier le métabolisme d'un microorganisme et pouvoir tester ses réponses aux changements environnementaux. Sans ces points de repères que sont les microorganismes connus, décrits et/ou cultivés, on ne pourrait pas faire d'hypothèse quant à l'affiliation et au rôle des organismes identifiés sur base de la présence de leur SSU rDNA. La microbiologie classique par observation directe et mise en culture et la microbiologie basée sur l'approche moléculaire sont donc complémentaires.

### **b) Le cas des microbialites actuels**

La plupart des études de diversité microbienne concernant des microbialites s'est concentrée sur les exemples marins ([Table 2](#)). Les groupes ciblés par les études sont avant tout les procaryotes et en particulier les bactéries, pour lesquelles un effort supplémentaire est en général réalisé pour décrire spécifiquement la diversité des cyanobactéries. La diversité des eucaryotes n'a finalement été que rarement ciblée et jamais en milieu lacustre ([Table 2](#)).

On peut s'interroger sur le fait que ces études soient comparables, en effet elles mettent en œuvre des techniques différentes qui introduisent des biais différents. Cependant on peut faire l'hypothèse qu'au premier ordre au moins, toutes les approches ne faisant pas intervenir la culture vont permettre de façon qualitative de révéler la présence des groupes majoritaires de microorganismes.

## INTRODUCTION

Site	Spécificité des amorces utilisées pour amplifier le SSU rDNA				Techniques					Auteurs
	Cyanobactéries	Bactéries	Archées	Eucaryotes	Culture	Banques de clones SSU rDNA	Pyroséquençage d'amplicons de SSU rDNA	ARISA	DGGE	
Stromatolite Shark bay	x	x	x		x	x				<i>Burns et al. 2004</i>
Stromatolite Shark bay		x	x			x				<i>Papineau et al. 2005</i>
Microbialites Lake Van	x	x				x				<i>Lopez-Garcia et al. 2005</i>
Stromatolite Bahamas (naturel/artificiel)		x				x		x		<i>Havemann et al. 2008</i>
Stromatolite Shark bay	x	x	x		x	x				<i>Goh et al. 2008</i>
Microbialites Cuatro Ciénegas	Métagénomique (pyroséquençage ADN total)									<i>Breibart et al. 2009</i>
Stromatolite Bahamas		x	x	x		x				<i>Baumgartner et al. 2009</i>
Stromatolite Bahamas	x				x	x				<i>Foster et al. 2009</i>
Stromatolite Shark bay	x	x	x	x		x				<i>Allen et al. 2009</i>
Thrombolite Bahamas	x	x	x	x		x		x		<i>Myshrall et al. 2010</i>
Stromatolites Ruidera Pools	x	x	x		x	x			x	<i>Santos et al. 2010</i>
Thrombolite Bahamas	x	x	x				x			<i>Mobberley et al. 2011</i>

**Table 2** : Présentation des études de diversité microbienne dans des microbialites actuels, des groupes taxonomiques étudiés ainsi que des techniques employées.

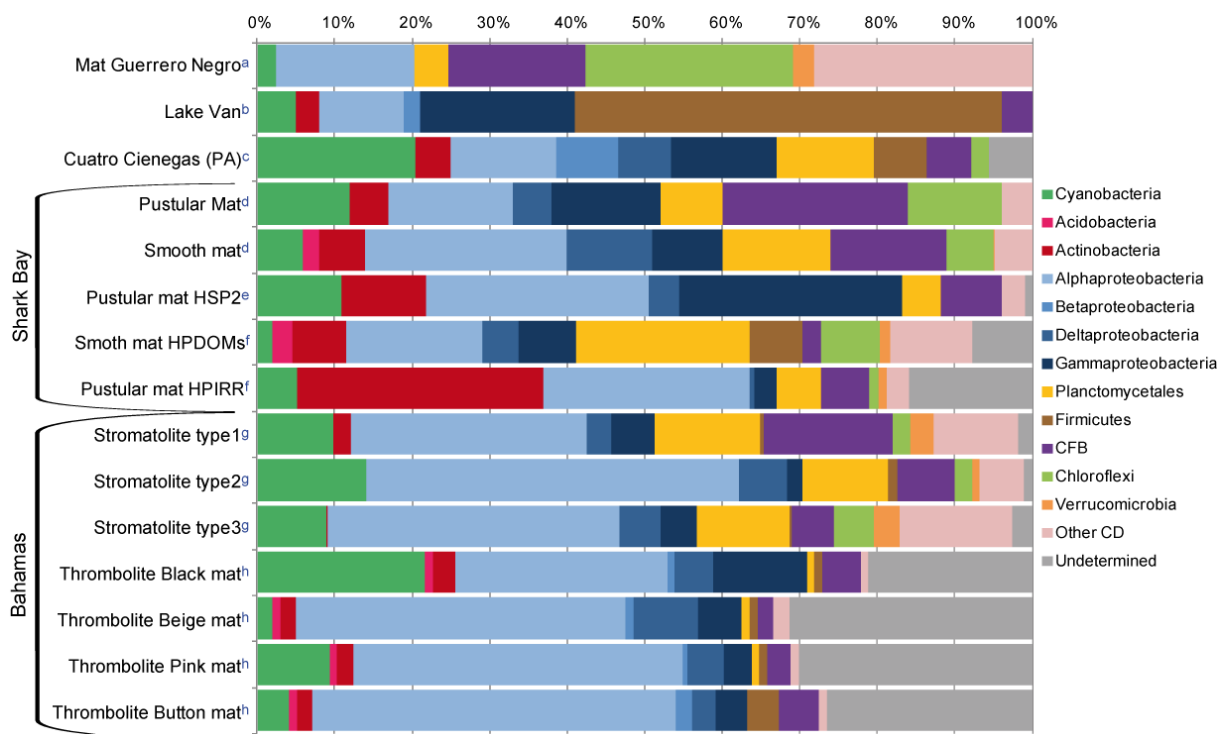
### (1) Les Bactéries

Des observations en microscopie optique des biofilms ont été réalisées. Elles mettent en évidence que ce sont les **cyanobactéries qui dominent les biofilms<sup>1</sup> en termes de biomasse**. Par exemple, *Schizothrix gebeleinii* (Oscillatoriales) est le contributeur majoritaire à la biomasse des stromatolites des Bahamas (*Stolz et al. 2001* ; *Golubic et al. 1996*). Si les différents ordres de cyanobactéries peuvent être discriminés morphologiquement sur la base de leur taille, fluorescence naturelle et diversité de morphologie (*Rippka 1988*), ce n'est pas le

<sup>1</sup> Biofilm : film physiquement cohérent de microorganismes qui adhèrent à un substrat (cf. Introduction-II-A-2)

## INTRODUCTION

cas de la plupart des autres groupes de bactéries. En effet la taille caractéristique des autres bactéries est le micromètre. De plus il existe peu de critères opérationnels permettant de distinguer les bactéries visuellement mis à part leur forme générale (coque ronde ou bacille allongé), leur type de paroi après coloration de Gram, ou la présence de pigments (*Madigan et al. 2009*). Dans tous les cas, ces critères sont très loin d'être suffisant pour discriminer la très grande diversité des phylums bactériens (*Figure 3*). Il est donc nécessaire d'employer des méthodes moléculaires pour la caractériser.



**Figure 4 :** Comparaison de la diversité des bactéries dans différents stromatolites à l'échelle des phyla : (b) (*Lopez-Garcia et al. 2005*), (c) (*Breitbart et al. 2009*), (d) (*Allen et al. 2009*), (e) (*Goh et al. 2009*), (f) (*Papineau et al. 2005*), (g) (*Baumgartner et al. 2009b*), (h) (*Mobberley et al. 2011*). Le tapis microbien de lagune hypersalée de Guerrero Negro (a) (*Ley et al. 2006*) est considéré comme un groupe externe.

Il est assez étonnant de remarquer qu'au premier ordre, toutes les communautés analysées (*Figure 4 et Table 2*) ont une structure globale relativement similaire quelque soit le milieu (**marin ou lacustre**) et la technique expérimentale utilisée (**clonage ou séquençage massif des SSU rDNA** amplifiés à partir de l'ADN de la communauté). Les tapis microbiens de Guerrero Negro (*Ley et al. 2006*), qui se trouvent en milieu hypersalé mais ne sont pas calcifiants servent de groupe extérieur dans la comparaison. Le lac Van (Turquie) fait exception ; les populations étant marquées par la domination des firmicutes qui ne

## INTRODUCTION

représentent que de 0% à 7% dans les autres microbialites. Ce point est sans doute à mettre en relation avec le fait que dans ce cas, la diversité microbienne a été évaluée à partir d'un échantillon stocké sec pendant 15 ans ce qui a certainement entraîné des changements dans la composition de la communauté à cause des différences de préservation entre organismes (Lopez-Garcia *et al.* 2005). Les autres communautés des microbialites sont dominées par les protéobactéries, en particulier les **alphaprotéobactéries** qui représentent entre 13% et 49% des séquences en fonction des échantillons. Viennent ensuite les **gammaprotéobactéries** (2%-29%), les **cyanobactéries** (2%-22%) et les **planctomycétales** (0%-22%) en proportions variables selon les échantillons (Figure 4). On note également que les échantillons des Bahamas se ressemblent beaucoup à l'échelle de la distribution des phyla bactériens. Ceci suggère que le type de macro-fabrique du microbialite (laminé dans le cas des stromatolites et grumeleux dans les cas des thrombolites) n'est pas un élément important du contrôle de la diversité microbienne. Donc soit des communautés semblables peuvent contribuer à former des morphologies variables de microbialites, soit la macro-fabrique est indépendante de l'activité de la communauté, soit la résolution phylogénétique présentée ici n'est pas suffisante pour pouvoir réellement comparer l'activité des communautés microbiennes. Ceci reste du domaine de la spéculation et est également à nuancer par le fait que dans l'étude de Mobberley *et al.* (2011), le séquençage massif a produit des séquences de 16S rDNA courtes (<400bp), ce qui a empêché l'affiliation de 20% à 30% des séquences bactériennes.

La construction de phylogénies avec les séquences de SSU rDNA permet de visualiser les liens de parenté entre les séquences, que l'on utilise comme proxy du lien de parenté entre les individus. Elle permet donc d'affilier les séquences à des taxons et en faisant l'hypothèse que plus les individus sont apparentés et plus ils se ressemblent du point de vue organisation et métabolisme, d'en déduire quels sont les métabolismes bactériens présents dans la communauté étudiée. En effet une séquence de SSU rDNA de la communauté se trouvant proche d'une séquence de SSU rDNA d'une souche cultivée et caractérisée, appartient certainement à un individu qui présente une organisation et un type métabolique similaires à ceux de la souche cultivée. Pour faire ce genre d'étude, il est donc nécessaire de posséder des séquences de souches de référence et également de pouvoir résoudre les relations phylogénétiques entre les séquences jusqu'à une échelle taxonomique très fine, ce qui implique de travailler avec des séquences de grande taille (possédant plus de caractères informatifs). Le principe qui consiste à construire la phylogénie du SSU rDNA pour y identifier des groupes fonctionnels sur la base de la comparaison entre les séquences de la

## INTRODUCTION

communauté étudiée et des séquences déjà caractérisées est généralisable à tous les domaines du vivant. Cependant il faut se placer à un niveau phylogénétique pertinent pour utiliser ce principe. Par exemple l'affiliation d'une séquence au phylum des cyanobactéries est suffisante pour en déduire que l'individu dont elle provient réalise la photosynthèse oxygénique alors que dans d'autres phylums il faudra aller jusqu'à l'échelle taxonomique du genre voire de l'espèce pour faire le même genre d'hypothèse.

La construction de phylogénies a été faite dans toutes les études de diversité microbienne associée aux microbialites (Table 2), cependant la diversité des bactéries étant élevée il est presque impossible de s'intéresser à chaque phylotype individuellement et les résultats présentés se placent en général à un rang taxonomique supérieur.

Un effort particulier a été fait pour décrire la diversité des cyanobactéries par détection du SSU rDNA avec des amorces spécifiques mais également par des expériences de mise en culture. Ainsi, l'étude de *Foster et al. (2009)* sur les cyanobactéries associées aux stromatolites des Bahamas a mis en évidence 33 phylotypes de cyanobactéries. Cette étude a confirmé la prédominance de cyanobactéries filamenteuses sans hétérocystes mais a également mis en évidence l'importance des cyanobactéries de type coccoïde dans la structuration du biofilm, ainsi que l'abondance des cyanobactéries endolithiques. (*Mobberley et al. 2011*) ont montré que la composition en cyanobactéries (majoritairement des Pleurocapsales vers le littoral remplacées par des Chroococcales vers le large) était un élément majeur qui expliquait la structuration des communautés microbiennes des thrombolites de la zone intertidale aux Bahamas.

### (2) Les archées

Les séquences d'archées représentent 7% des séquences analysées de l'étude exhaustive de *Papineau et al. (2005)* des stromatolites de Shark Bay. On trouve essentiellement des Euryarchaeota de la classe des Halobacteria dont la plupart sont connues pour vivre en milieu hypersalé. Ceci est cohérent avec l'environnement du lagon de Shark Bay. Les archées ont aussi été détectées dans les stromatolites et thrombolites des Bahamas (*Baumgartner et al. 2009b; Mobberley et al. 2011*) et dans les microbialites de Cuatro Ciénegas (*Breitbart et al. 2009*) en faible proportion (1-2% du total des séquences). Il s'agissait d'Euryarchaeota et de Crenarchaeota. Le rôle et l'importance écologique des archées dans ces systèmes demeurent inconnus.

## INTRODUCTION

### (3) Les protistes

La diversité des protistes associée aux microbialites a tout d'abord été étudiée par observation au microscope optique. Des diatomées (*Winsborough et al. 1987*), des algues vertes unicellulaires (*Freytet et al. 1998*) mais également des champignons filamenteux endolithiques (*Arp et al. 2003*) ont été observés dans les tapis microbiens. Ces organismes pourraient contribuer à la formation des microbialites ou au contraire à leur déstabilisation. En effet, il a été proposé que les diatomées et les algues vertes qui font la photosynthèse pourraient induire une augmentation locale du pH contribuant à faire précipiter les carbonate de calcium/magnésium (*Winsborough et al. 1987; Freytet et al. 1998*). De plus les diatomées produisent une grande quantité d'EPS qui peuvent piéger les particules en suspension et contribuer ainsi à l'accrétion du microbialite (*Winsborough et al. 1987*). Enfin les champignons sont hétérotrophes ; ils contribuent donc à la minéralisation des nutriments. De plus les champignons endolithiques sont capables de dissoudre le substrat et peuvent ainsi contribuer à déstabiliser la structure sédimentaire en la rendant poreuse mais ils peuvent également contribuer à la renforcer dans les cas où leur activité induit la néoformation de minéraux carbonatés (*Hoppert et al. 2004; Golubic et al. 2005; Kolo et al. 2007*).

La détection des protistes par biologie moléculaire dans les tapis microbiens associés aux microbialites n'a été tentée que très récemment. Cela a été fait par clonage en utilisant des amorces d'amplification qui ciblaient tous les eucaryotes dans les stromatolites de Shark Bay (*Allen et al. 2009*) et des Bahamas (*Myshrall et al. 2010*). Cependant dans ces deux cas, les analyses ont révélé essentiellement la présence de nématodes (métazoaire). Ce résultat est sans doute biaisé par le fait que chaque nématode individuellement est composé d'un très grand nombre de cellules possédant toutes le même SSU rDNA. Au moment de l'amplification puis du clonage du SSU rDNA il est donc très probable d'échantillonner de nombreuses fois un même individu nématode qui aura contribué par de nombreuses cellules alors qu'un individu protiste ne contribue que par une seule cellule. Ainsi la diversité des protistes dans les microbialites n'est pas bien connue et a sans doute été sous-estimée. Par exemple, (*Mobberley et al. 2011*) ont renoncé à s'intéresser aux eucaryotes dans leur étude par ailleurs plutôt exhaustive par pyroséquençage des amplicons de SSU rDNA des communautés microbiennes des thrombolites des Bahamas. Les approches moléculaires n'ont donc pour l'instant pas vraiment apporté d'informations supplémentaires quant au rôle et à la diversité des protistes dans ces systèmes alors que l'on sait que ce sont des organismes importants dans le fonctionnement des communautés microbiennes. En effet, on trouve au

## INTRODUCTION

sein des protistes aussi bien des autotrophes que des hétérotrophes impliqués dans différentes relations interspécifiques, allant de la prédation, à la symbiose ou au parasitisme. (*Madigan et al. 2009; Walker et al. 2011*)

### 2. Organisation des microorganismes en biofilms

Comme nous venons de le voir, les communautés microbiennes associées aux microbialites sont très diverses. Elles sont structurées en biofilm, c'est-à-dire en films physiquement cohérents de microorganismes qui adhèrent au substrat minéral. La cohésion de la communauté est en partie la conséquence de la production, par certaines bactéries et diatomées, d'exopolymères (EPS) qui forment un gel continu entre les individus. Ce gel permet les interactions directes et à distance par signalement chimique. Dans une telle communauté, des liens écologiques se mettent en place entre les microorganismes, conférant à l'ensemble des propriétés émergentes telles qu'une meilleure tolérance à certains stress environnementaux (*Moons et al. 2009*).

**Il existe une relation réciproque entre la stratification du biofilm et les microorganismes qui occupent ces strates :** (i) les gradients physico-chimiques qui s'établissent dans le biofilm influencent la distribution des microorganismes en fonction de leurs préférences d'habitat et (ii) les microorganismes modifient les paramètres chimiques du biofilm par le biais de leur productions métaboliques. Il s'établit une stratification des microorganismes en regard du gradient rédox dans le biofilm (*Canfield et al. 2009*).

Les biofilms associés aux stromatolites des Bahamas ont été très bien caractérisés par le suivi *in situ* des paramètres physico-chimiques grâce à l'emploi de microélectrodes (*Visscher et al. 1998*). Ces auteurs ont mis en évidence que le biofilm est **stratifié** : les premiers millimètres sont oxygénés tandis que plus en profondeur il est anoxique et est dominé par la présence d'ions sulfures. Cette limite fluctue de façon journalière ; l'oxygène fait un pic au plus fort du jour associé à un pic de pH qui peut localement atteindre des valeurs de 10-11. Les ions sulfures sont eux présents en plus grande quantité la nuit et diffusent plus haut presque jusqu'au sommet du biofilm. A ce moment là, le pH du biofilm est homogène autour de la neutralité (*Visscher et al. 1998; Dupraz et al. 2009*). Si ce genre de mesures *in situ* apporte des informations essentielles, elles restent rares. Ceci est sans doute lié au fait que l'usage des microélectrodes est impossible dans les cas de biofilms fins et fortement minéralisés (*Myshrall et al. 2010*), en effet les microélectrodes sont très fragiles et ne peuvent être insérées dans un milieu induré.



## INTRODUCTION

Ces mesures couplées à des observations directes (par exemple la présence de différents types de pigments) mettent en évidence la stratification des microorganismes en fonction de leur métabolisme. Ainsi la production d'oxygène en surface est à mettre en relation avec la présence à ce niveau d'une couche de cyanobactéries et signe la **photosynthèse oxygénique** (Myshrall *et al.* 2010). La **sulfato-réduction** a été mise en évidence expérimentalement dans une couche inférieure et correspond à la zone de production des ions sulfures (Visscher *et al.* 1998; Visscher *et al.* 2000).

Ces données mettent en évidence que les processus qui nous intéressent, c'est-à-dire les rôles des microorganismes dans la formation des microbialites, ont lieu à une échelle très locale. En effet les communautés microbiennes qui comptent des centaines d'espèces aux potentialités métaboliques diverses sont structurées spécialement sur quelques millimètres. **L'échelle pertinente** pour la description des relations entre les microorganismes ainsi que des relations entre microorganismes et minéraux est donc l'échelle de l'individu c'est-à-dire ici le **micromètre** voire même une échelle inférieure si on s'intéresse aux interfaces entre les différentes entités.

### B. Modèle de précipitation des carbonates

On ne s'intéresse ici qu'aux microbialites de type carbonaté ; la composante minérale est donc un carbonate de calcium ou de magnésium. Afin de comprendre comment se forment les microbialites, il faut s'intéresser aux facteurs qui contrôlent la précipitation des carbonates. Il en existe deux types : **les facteurs biotiques et les facteurs abiotiques**.

#### 1. Deux éléments requis : sursaturation et point de nucléation

Pour qu'une phase minérale précipite, il faut que la solution soit sursaturée par rapport à cette phase. De plus, il est généralement admis que plus la sursaturation est grande, plus la probabilité que la précipitation intervienne effectivement est élevée (on peut alors franchir les éventuelles barrières cinétiques). Pour une solution donnée, on peut calculer un **indice de saturation (SI)** vis-à-vis de chaque phase minérale qui dépend de l'activité des espèces dissoutes en solution. Par exemple, pour de la calcite ( $\text{CaCO}_3$ ) :

$$SI = \log \frac{[Ca^{2+}] \times [CO_3^{2-}]}{K_s}$$

## INTRODUCTION

Où  $K_s$  est la constante de solubilité de valeur  $10^{-6.37}$  à 25°C et à la pression atmosphérique (Dupraz *et al.* 2009). Ainsi si la concentration en ions (cations divalents ou carbonates) disponibles augmente, SI augmente également. Il a été montré empiriquement qu'il fallait que l'indice de saturation **SI soit supérieur à 1** pour que la précipitation de calcite ait lieu de façon spontanée dans la plupart des milieux (Arp *et al.* 2001).

Le second pré-requis pour que la précipitation ait lieu est que la **nucléation** se fasse c'est-à-dire, que le processus de précipitation s'amorce par la formation de nano-clusters amorphes qui sont les germes de la croissance cristalline (Pouget *et al.* 2009). Cette étape peut être favorisée par la présence de points de nucléation dans le milieu comme par exemple les molécules organiques exposées dans le milieu que sont les EPS (exo-polymeric substances).

### 2. Le rôle des EPS (exo-polymeric substances)

Les EPS forment une matrice autour des microorganismes qui composent le biofilm. Les EPS sont produits en grande quantité par les cyanobactéries (Decho *et al.* 2005) et les bactéries sulfato-réductrices (Braissant *et al.* 2007) mais également par les diatomées (Wolfstein *et al.* 2002). Parmi les polymères qui les constituent, on trouve des polysaccharides et des peptides présentant des fonctions chimiques de type acide carboxylique, amine, ou encore sulfurées qui ont un pouvoir tampon (Braissant *et al.* 2007). Or, les **groupes carboxyliques chélatent les cations divalents** (en particulier  $\text{Ca}^{2+}$  et  $\text{Mg}^{2+}$ ), les rendant indisponibles pour la précipitation (SI diminuant) (Dupraz *et al.* 2005). Ainsi dans un premier temps, les EPS inhibent la précipitation des carbonates. Si la concentration des cations divalents excède largement le pouvoir de saturation **du réseau d'EPS ou si celui-ci est dégradé par des bactéries** hétérotrophes, notamment les bactéries sulfato-réductrices (Decho *et al.* 2005; Dupraz *et al.* 2005), alors des cations divalents libres seront disponibles de nouveau et la précipitation pourra alors avoir lieu.

Par ailleurs, les EPS fournissent des points de nucléation pour la précipitation et donc peuvent favoriser la nucléation (Braissant *et al.* 2003). En effet il a été proposé que la réorganisation des sites chélateurs de cations après l'altération des EPS pourrait former un patron régulier favorisant la nucléation minérale (Dupraz *et al.* 2005).

Les **EPS ont donc un rôle majeur et ambivalent** dans le processus de précipitation des carbonates dans le biofilm. C'est à l'échelle locale que s'enclenche la biominéralisation, en relation avec la diversité des fonctions chimiques portées par les EPS et avec les conditions

## INTRODUCTION

environnementales, elles-mêmes en partie contraintes par l'activité des microorganismes adjacents. Le nombre d'éléments biotiques et abiotiques, ainsi que l'échelle spatiale et temporelle des premiers stades de la biominéralisation constituent une barrière qui pour l'instant limite notre compréhension de ces phénomènes.

### 3. La biominéralisation : résultat net des interactions entre groupes fonctionnels de microorganismes

Lorsqu'on s'intéresse à la formation des biominéraux, on oppose classiquement la **biominéralisation contrôlée** (*Bazylinski et al. 2003*) et la **biominéralisation induite** (*Lowenstam 1981; Frankel et al. 2003*). La biominéralisation induite intervient comme une conséquence indirecte des processus métaboliques du vivant qui modifient leur environnement (pH, CO<sub>2</sub>, concentration en ions). La conséquence est l'hétérogénéité des minéraux formés dont la composition varie avec celle de l'environnement extérieur. Dans le cas de la biominéralisation contrôlée, la nucléation, la croissance, la morphologie et la localisation du minéral sont contrôlés par la cellule. C'est dans ce cas l'activité cellulaire elle-même qui contrôle « activement » la précipitation (*Weiner et al. 2003*). Certains auteurs ont également proposé de distinguer la **biominéralisation influencée**, dans laquelle la biominéralisation est un phénomène d'origine abiotique (par évaporation et augmentation de l'activité des espèces dissoutes) mais facilitée par la présence d'une matrice organique comme point de nucléation. Enfin il a été proposé de regrouper la biominéralisation influencée et induite sous le terme d'**organominéralisation** car il est très difficile de les distinguer dans la pratique (*Dupraz et al. 2009*).

Ces définitions s'avèrent n'être pas opérationnelles pour plusieurs raisons. La première est que les phénomènes recouverts par ces différents termes diffèrent selon les auteurs (*Dupraz et al. 2009*). Ensuite on ne connaît en général pas assez bien les mécanismes de la biominéralisation qui a lieu pour pouvoir la ranger dans une catégorie. Enfin d'après les exemples connus, le niveau de contrôle de la biominéralisation par le vivant ne semble pas pouvoir être discrétisé (*Benzerara et al. 2009*). Comme toutes les taxonomies, celle de la formation des biominéraux est arbitraire, de plus elle n'est pas nécessaire pour décrire et aborder les mécanismes de la formation des biominéraux c'est pourquoi ces termes ne seront pas employés dans la suite de ce manuscrit.

## INTRODUCTION

### a) Métabolismes favorisant la précipitation des carbonates

#### (1) Photosynthèse oxygénique

La photosynthèse oxygénique est réalisée par **les cyanobactéries et par les chloroplastes**. C'est un métabolisme autotrophe dont la source d'énergie est l'énergie lumineuse du soleil reçue par les pigments photosynthétiques et la source d'électrons est l'eau. C'est le **métabolisme essentiel de la production primaire dans les biofilms associés aux microbialites modernes**. L'équation-bilan de la photosynthèse, couplée à celle de la précipitation de carbonates de calcium peut s'écrire comme ceci (*Visser et al. 1998*) :



Il a été mesuré une augmentation du pH à proximité des cyanobactéries liée à leur activité photosynthétique (*Visser et al. 1998; Myhrall et al. 2010*). Cet excès d'alcalinité est lié à la fixation de dioxyde de carbone par la photosynthèse qui favorise la production d'ions carbonates. Les ions carbonates forment avec le calcium, de la calcite ou de l'aragonite (*Dupraz et al. 2009*).

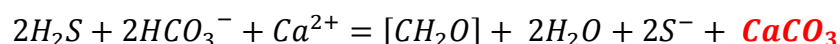
Un modèle a été proposé pour expliquer la mécanique de cette augmentation d'alcalinité dans le cas des cyanobactéries (*Riding 2006a; Jansson et al. 2010*). En effet la fixation du CO<sub>2</sub> fait intervenir **l'anhydrase carbonique** qui convertit les ions HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> en CO<sub>2</sub> au niveau du carboxysome produisant un ion OH<sup>-</sup>. Cet ion est exporté et est à l'origine de l'augmentation de pH mesurée à l'extérieur de la cellule. Celle-ci induit la conversion des ions HCO<sub>3</sub><sup>3-</sup> en ions CO<sub>3</sub><sup>2-</sup> qui forment selon les cations disponibles en solution des carbonates de Ca et/ou de Mg (**Figure 5**). Ce mécanisme est proposé comme étant à la base de la précipitation de **carbonates dans les gaines cyanobactériennes** et expliquerait donc leur préservation sous forme de « calcimicrobes » (*Planavsky et al. 2009; Jansson et al. 2010*).

La photosynthèse oxygénique contribue de façon majeure à la précipitation des carbonates de calcium/magnésium et à l'édification des microbialites. Pour certains auteurs, c'est le seul mécanisme capable d'induire la précipitation des carbonates de manière significative (*Aloisi 2008*) ; pour d'autres, ce n'est qu'un mécanisme parmi d'autres contribuant assez peu à la croissance nette de la partie minérale (*Baumgartner et al. 2006*). En effet, la photosynthèse n'est active que le jour et son effet est annulé la nuit par la respiration, donc le bilan net de précipitation devrait être quasi-nul (*Visser et al. 1998*).

## INTRODUCTION

### (2) Photosynthèse anoxygénique

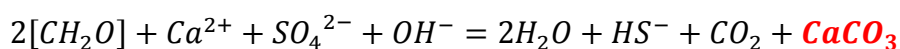
La photosynthèse anoxygénique est également un métabolisme autotrophe ; la source d'énergie est la lumière reçue par les pigments de type bactériochlorophylle et la source d'électrons est en général le  $H_2S$  (cela peut-être également le  $H_2$  et le  $Fe^{2+}$ ) (Madigan et al. 2009). La photosynthèse anoxygénique est réalisée par une certaine diversité de taxons bactériens : certaines alpha et gammaprotéobactéries ainsi que une partie des Chloroflexi et des Chlorobi (Sievert et al. 2007). De plus, des gènes des photosystèmes sont aussi présents chez quelques représentants d'autres phylums qui peuvent ainsi tirer une partie de leur énergie de la lumière mais qui ne sont pas capables de faire la photosynthèse, s'agissant donc des photohétérotrophes. C'est les cas des héliobactéries (Gram positives) (Sievert et al. 2007) (Madigan et al. 2009) et vraisemblablement d'une acidobactérie (*Chroracidobacterium*) (Bryant et al. 2007). L'équation-bilan de cette réaction peut s'écrire comme ceci :



De même que pour la photosynthèse oxygénique, la fixation de  $CO_2$  entraîne le déplacement de l'équilibre des carbonates vers la production d'ions carbonate et favorise la précipitation des carbonates de calcium/magnésium. Si la photosynthèse anoxygénique est le mode de production primaire dans certains tapis microbiens de milieux hypersalés (Ley et al. 2006) par exemple, elle contribue sans doute peu à la production primaire au niveau des microbialites actuels. Cependant, il a été montré expérimentalement qu'elle pouvait réellement induire la précipitation de carbonates de calcium/magnésium (Bosak et al. 2007). Les mécanismes et l'importance de ce métabolisme dans la communauté microbienne des microbialites restent à déterminer.

### (3) Sulfato-réduction

La sulfato-réduction est un métabolisme qui couple l'oxydation de la matière organique (parfois du  $H_2$ ) à la réduction des sulfates (Madigan et al. 2009). Ce métabolisme est réalisé par quelques archées et par des bactéries, en particulier la plupart des deltaprotéobactéries, quelques Firmicutes et quelques Nitrospirae (Muyzer et al. 2008). La réaction-bilan de la sulfato-réduction hétérotrophe peut s'écrire comme ceci :



La sulfato-réduction a été proposée un peu avant les années 2000 comme étant un contributeur majeur à la formation des microbialites (Visscher et al. 1998). En effet, la

## INTRODUCTION

production de  $\text{HS}^-$  a été observée et la sulfato-réduction a été mise en évidence expérimentalement (*Vischer et al. 2000*). Ce mécanisme agit doublement en faveur de la précipitation des carbonates de calcium/magnésium, d'une part directement par la **production d'alcalinité** et d'autre part indirectement car il contribue à la dégradation de la matière organique des EPS et ainsi libère les cations divalents (*Decho et al. 2005; Baumgartner et al. 2006*).

### b) Métabolismes favorisant la dissolution des carbonates

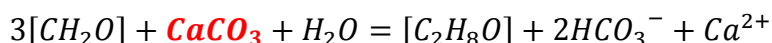
#### (1) Respiration aérobie et fermentation

La respiration et la fermentation sont les métabolismes qui oxydent la matière organique. Dans le cas de la respiration aérobie, ceci est couplé à la réduction l'oxygène (ou d'autres composés oxydés tels que  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{NO}_3^-$ , ou le  $\text{CO}_2$  par exemple dans le cas d'autres types de respirations)(*Madigan et al. 2009*). Les équations-bilan de ces réactions peuvent s'écrire ainsi :

##### *Respiration aérobie*



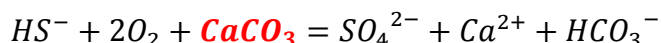
##### *Fermentation alcoolique*



Ces réactions acidifient le milieu par la production de  $\text{CO}_2$  et ont donc tendance à dissoudre les carbonates. Ces métabolismes ont lieu jour et nuit mais leur activité est en particulier détectable la nuit quand la photosynthèse n'a plus lieu (*Dupraz et al. 2005*)

#### (2) Sulfoxydation (aérobie)

La sulfoxydation est un métabolisme qui oxyde les  $\text{HS}^-$  en  $\text{S}^0$  et/ou  $\text{SO}_4^{2-}$ . C'est un type de respiration où le substrat est  $\text{HS}^-$ . Ce métabolisme est présent chez certaines protéobactéries et Aquificales (*Sievert et al. 2007*). La réaction bilan de cette réaction peut s'écrire ainsi :

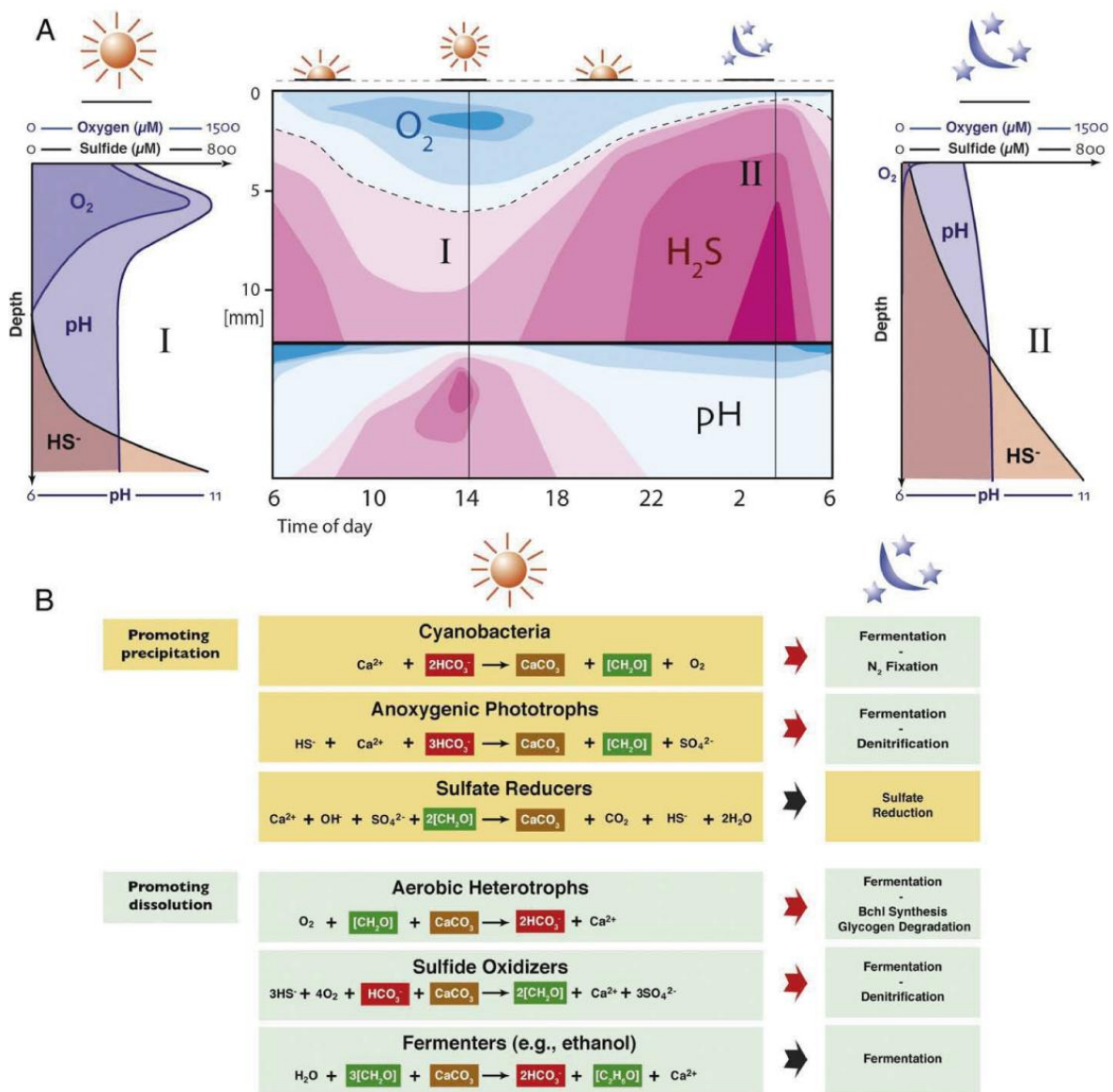


Comme dans le cas précédent, ce métabolisme favorise la dissolution des carbonates. Néanmoins son influence dans les microbialites reste à évaluer.

## INTRODUCTION

Ce panorama met en évidence que des microorganismes appartenant à des groupes taxonomiques similaires ou différents peuvent réaliser le même métabolisme. Il est donc important **de bien caractériser la diversité phylogénétique des microorganismes associés aux microbialites** et d'estimer leur niveau d'activité afin de comprendre si **le bilan net à l'échelle de la communauté ira dans le sens de la précipitation ou au contraire de la dissolution des carbonates de calcium/magnésium.**

### c) Vers un modèle intégratif



**Figure 5 :** Fluctuations verticales journalières des gradients géochimiques dans un tapis microbien et réactions métabolico-géochimiques contribuant à la précipitation ou dissolution des carbonates dans

## INTRODUCTION

le système. (A) Variations de  $O_2$ ,  $HS^-$  et du pH dans un tapis microbien durant une journée de 24h. Les panneaux I et II sont des instantanés du panneau central à respectivement 14h et 03h. (B) Six groupes métaboliques majeurs de microorganismes contribuant à la précipitation/dissolution des carbonates. Les équations sont des combinaisons des équations métaboliques et géochimiques. La précipitation nette dépend de la balance entre les activités métaboliques ainsi que de la répartition dans le temps et dans l'espace des différents groupes fonctionnels de microorganismes. *Figure extraite de Dupraz et al. Earth-Science Reviews 96 (2009) 141–162*

En se basant sur les observations directes des biofilms et sur les prédictions de la contribution des différents métabolismes à la précipitation/dissolution des carbonates *Dupraz et al. (2005)* puis (*Dupraz et al. 2009*) ont proposé un modèle qui intègre les différents métabolismes et explique la stratification des microorganismes dans le biofilm (**Figure 5**). La précipitation des carbonates aurait donc lieu pendant la journée essentiellement grâce à la photosynthèse et pendant la nuit via la sulfatoréduction. Ce modèle a été établi grâce aux nombreuses études des stromatolites marins des Bahamas ; à l'inverse les connaissances sur les systèmes lacustres restent dispersées. Les stromatolites marins se forment essentiellement par accrétion de particules sédimentaires (*Reid et al. 2000b*). Les microbialites lacustres formés eux par précipitation in-situ (eg. *Kempe et al. 1991*; *Braithwaite et al. 1994*) constituent donc un système différent également important à étudier dans le cadre de l'analogie avec les stromatolites fossiles. De plus l'importance relative de la photosynthèse et de la sulfatoréduction reste une question discutée.

**La question du mécanisme de la précipitation des carbonates dans les microbialites n'est pas résolue. C'est en fait un processus complexe qui naît d'une balance fine entre paramètres abiotiques et biotiques.**



### Objectifs & Plan de ma thèse

L'objectif central de ce travail est de contribuer à augmenter notre niveau de connaissance/compréhension de la formation des microbialites modernes, en particulier du rôle et du devenir des microorganismes dans ces systèmes afin de mieux contraindre l'interprétation du registre fossile des stromatolites.

Pour cela j'ai travaillé sur le système modèle des **microbialites actuels du lac d'Alchichica au Mexique**.

Une première étape nécessaire pour la compréhension d'un système complexe, est la description de celui-ci. C'est pourquoi dans un premier temps je me suis attachée à répondre à la question : *quelles sont les phases minérales et les microorganismes présents dans les microbialites d'Alchichica ?* Cette étude fait l'objet de **la première partie** de cette thèse.

La première partie permet de circonscrire les potentialités métaboliques des communautés présentes et chimiques des phases minérales associées. Ces informations cruciales ont ensuite été complétées par l'observation et la description des relations qui existent entre les minéraux et les microorganismes.

**La seconde partie** aborde ainsi les questions suivantes : *Quel est le rôle des microorganismes dans la précipitation des minéraux ? Et quel est le devenir de la matière organique lors de la précipitation minérale ? Y a-t-il formation de microfossiles ?* Pour apporter des éléments de réponse à ces questions je me suis concentrée plus particulièrement sur les relations qui existent entre un ordre de cyanobactéries, les Pleurocapsales et la précipitation d'aragonite (carbonate de calcium). Cette partie présente l'étude d'un cas de biominéralisation extracellulaire potentiellement induite par l'activité des cyanobactéries ainsi que le devenir de la matière organique au cours du processus de fossilisation de celles-ci.

Enfin, dans une **troisième partie**, consacrée à la biominéralisation intracellulaire j'aborderai les questions suivantes : *Quel est le mécanisme de la biominéralisation intracellulaire ? Quelle est la nature des minéraux formés intracellulairement ? Quels taxons sont capables de réaliser ce type de biominéralisation et dans quelles conditions ? Quelle est l'évolution du patron de biominéralisation au sein du phylum des cyanobactéries ?* La biominéralisation intracellulaire n'était pas connue jusqu'ici chez les cyanobactéries. Je présenterai dans cette

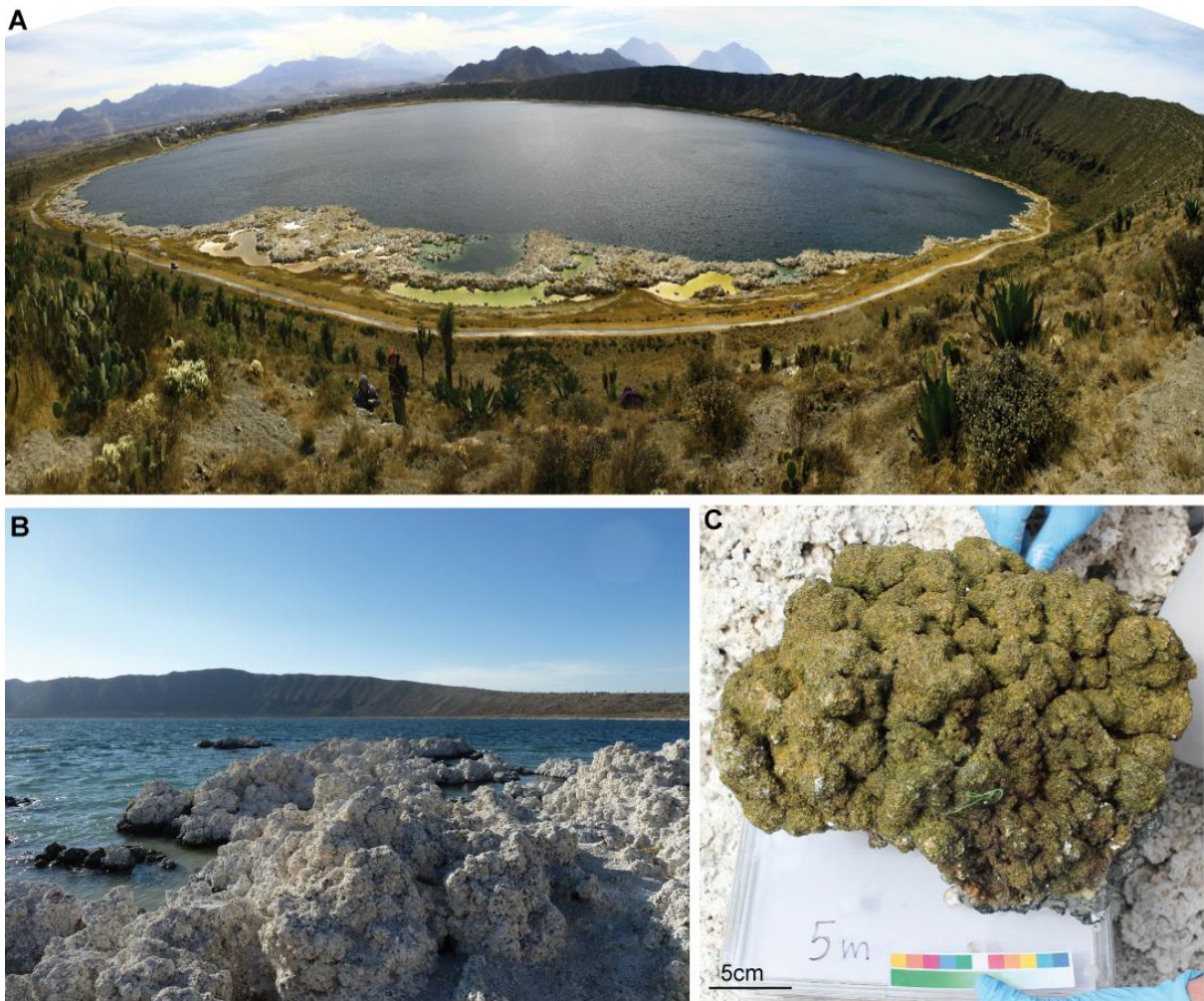
## OBJECTIFS

section des données descriptives concernant deux souches de cyanobactéries capables de réaliser la biominéralisation intracellulaire ainsi que les implications de cette découverte.



## Matériel et méthodes

### I. Présentation du système d'étude : le lac d'Alchichica



**Figure 6 :** Photo du lac alcalin d'Alchichica (Mexique). **(A)** Vue panoramique du lac (photo Anabel Lopez-Archilla, ligne d'horizon au sud), **(B)** Microbialites sub-fossiles qui forment une ceinture à la périphérie du lac **(C)** fragment de microbialite vivant prélevé à 5m de profondeur

#### A. Paramètres physico-chimiques du lac d'Alchichica

Les échantillons de microbialites étudiés dans cette thèse ont été prélevés lors d'une campagne de terrain en juin 2007 dans le lac d'Alchichica au Mexique. Le lac d'Alchichica

est un lac de cratère de région tropicale. Il se situe à moyenne altitude (2340 m) et a une profondeur de 63 m au maximum (*Armienta et al. 2008*). Il est monomictique, c'est-à-dire que les eaux du lac ne se mélangent qu'une fois par an, en l'occurrence de janvier à avril. Le reste de l'année, elles sont stratifiées, c'est-à-dire que la colonne d'eau est oxygénée en haut et qu'à partir d'une profondeur de 40 m environ elle devient anoxique (*Alcocer et al. 2001; Macek et al. 2008*).

La chimie du lac a été caractérisée au moment du prélèvement des échantillons étudiés dans ce travail (*Kaźmierczak et al. 2011*). Le lac est hyperalcalin avec un pH de 8,9. Les eaux du lac sont caractérisées par un rapport Mg/Ca=50 et une forte alcalinité (30,9 meq.l<sup>-1</sup>). Les eaux sont sursaturées vis-à-vis de différents carbonates : l'aragonite (SI 0,9), la calcite (SI 1,05), la dolomite (SI 3,9), l'hydromagnésite, (SI 0,68), la magnésite (SI 2,28) et la huntite (SI 5,2). La pression partielle en CO<sub>2</sub> a été calculée à 1265 ppmv, c'est-à-dire qu'il y a quantitativement plus de production de CO<sub>2</sub> que de fixation de carbone à l'échelle du lac. (*Kaźmierczak et al. 2011*).

Le lac d'Alchichica est également caractérisé par la présence de nombreux microbialites. Certains sub-fossiles ont émergé récemment à cause de la descente du niveau phréatique et forment une couronne de microbialites autour du lac ([Figure 6](#)). D'autres sont actuellement en formation dans le lac jusqu'à une profondeur d'au moins 14 m.

### **B. Les échantillons et les cultures**

#### **a) Les échantillons du lac et des aquariums**

Le lac a été échantillonné de la surface jusqu'à 14 m de profondeur en juin 2007, les échantillons sont des fragments de microbialites. Une partie des échantillons a été fixée à l'éthanol juste après prélèvement afin de fixer les communautés microbiennes au temps t du prélèvement ; une autre partie a été séchée et conservée au sec. Enfin six échantillons ont été transportés « vivants » dans des boîtes hermétiques avec de l'eau du lac et ont été mis en culture au laboratoire d'Orsay (ESE) dans des aquariums. La [table 3](#) résume l'origine des différents échantillons et les analyses dont ils ont fait l'objet.

# MATÉRIEL&MÉTHODES

Echantillon	Profondeur (m)	Lieu de prélèvement	Conservation	Banques de clones (SSUr DNA)	DGGE	Microscopies	DRX
AL10	0	N 19°24.468; W 97° 24.417	Sec			x	x
AL13	0,1	N 19° 25.160; W 97° 23.901	Sec			x	
AL29	0,08	N 19° 24.715; W 97° 23.681	Fixé dans l'éthanol		x		
AL30	0,5	idem	Vivant> culture	Aquarium 1			
AL31		idem	Fixé dans l'éthanol	x	x		
AL26	0,8	idem	Vivant> culture	Aquarium 2			
AL27		idem	Fixé dans l'éthanol		x		
AL42	1	idem	Vivant> culture	Aquarium 2			
AL43		idem	Fixé dans l'éthanol		x		
AL36	1,5	idem	Fixé dans l'éthanol		x		
AL38	2	idem	Fixé dans l'éthanol		x		
AL69	3	N 19° 25.119; W 97° 23.860	Vivant> culture	Aquarium 1			
AL69		idem	Sec			x	x
AL70	4	idem	Fixé dans l'éthanol		x		
AL66		idem	Sec			x	
AL67	5	idem	Fixé dans l'éthanol	x	x		
AL63		idem	Sec			x	
AL64	6	idem	Fixé dans l'éthanol		x		
AL60		idem	Vivant> culture	Aquarium 2			
AL60	8	idem	Sec				x
AL61		idem	Fixé dans l'éthanol		x		
AL57	11	idem	Vivant > culture	Aquarium 1			
AL57		idem	Sec			x	x
AL58	14	idem	Fixé dans l'éthanol		x		
AL54		idem	Sec				x
AL55	14	idem	Fixé dans l'éthanol		x		
AL51		idem	Sec			x	
AL52		idem	Fixé dans l'éthanol	x	x		

**Table 3 :** Nom, profondeur d'échantillonnage, lieu de prélèvement et mode de stockage des fragments de microbialites étudiés dans cette thèse. Les croix dans les quatre dernières colonnes indiquent les expériences dans lesquelles les différents échantillons ont été utilisés.

## MATÉRIEL&MÉTHODES

Deux aquariums contenant chacun trois fragments de microbialites (Figure 6 et Table 3) ont été installés à Orsay en juillet 2007. L'aquarium 1 (AQ1) est caractérisé par une photopériode de 12 h d'éclairement alors que l'aquarium 2 (AQ2) reçoit 16 h d'éclairement par jour. L'éclairage se fait grâce à un tube fluorescent par aquarium de type SunGlo de 15 W reproduisant le spectre solaire complet. Les aquariums ont été remplis initialement par de l'eau du robinet de la ville d'Orsay (France) et laissés stabiliser pendant 2-3 jours avant d'y introduire les fragments des microbialites d'Alchichica avec le volume d'eau du lac dans lequel ils ont été transportés. Le fond des aquariums est tapissé de fragments centimétriques de microbialites subfossiles ramassés au bord du lac d'Alchichica. Le pH et la température ainsi que la chimie de l'eau ont été suivis régulièrement et l'évaporation a été compensée par ajout régulier d'eau désionisée. Les prélèvements pour les analyses de diversité microbienne ont eu lieu au seizième mois (construction de la banque 1) puis au vingt-septième mois (construction de la banque 2) mois après le début des cultures. Des morceaux de microbialites et de biofilms ont été prélevés plusieurs fois par an pour les observations microscopiques.



## MATÉRIEL&MÉTHODES



**Figure 7 :** Photographies des aquariums 1 et 2 lors de leur mise en place en juillet 2007 et environ 3 ans plus tard en mai 2010. L'aquarium 1 est éclairé 12h par jour alors que l'aquarium 2 est éclairé 16h par jour. On note une homogénéisation de l'aspect des différents fragments de microbialites au cours du temps dans chaque aquarium ainsi qu'un développement important du biofilm sur le fond et les parois des aquariums.



### **b) Préparation des échantillons pour les observations de microscopie**

Les échantillons en condition hydratée ont été déposés sur filtre ou lame de verre pour l'observation d'un état frais puis laissés à l'air dans le cas d'une observation à sec. Les échantillons hydratés ont été observés par microscopie plein champ, à épifluorescence et confocale selon les cas. Les échantillons secs ont pu eux être observés par microscopie électronique à balayage ou spectro-microscopie d'absorption des rayons X.

Certains échantillons de microbialites secs ont été coupés à la scie diamant en section épaisse (3-5 mm) et polis jusqu'au  $\frac{1}{4}$   $\mu\text{m}$  avec de la pâte diamant.

Afin de préserver les interfaces entre les microorganismes et les minéraux, d'autres échantillons de microbialites ont été inclus dans la résine LR-white (Polysciences, Inc.) après avoir été colorés à la calcéine (0,1 mg/l à 4 °C pendant 48 h) et au DAPI (1  $\mu\text{g/l}$  à température ambiante pendant 2 h). La calcéine colore les ions calcium libres et peut permettre ainsi théoriquement le marquage des carbonates formés durant l'incubation (*Moran 2000*). Le DAPI colore l'ADN et permet de marquer tous les microorganismes vivants, y compris ceux qui ne sont pas naturellement fluorescents. Les échantillons ont ensuite été déshydratés dans des bains d'éthanol de concentration croissante (30%, 50%, 70%, 90%, puis 100%). L'imprégnation par la résine a été faite à 4 °C pendant 18 h d'abord par un mélange 1:1 puis 2:1 de résine/éthanol et finalement par de la résine uniquement. La polymérisation de la résine a commencé à température ambiante pendant 3 h puis à 40 °C pendant une heure et enfin à 60 °C pendant 24 h. Les blocs inclus ont ensuite été coupés grâce à une scie diamant à eau et polis jusqu'au  $\frac{1}{4}$   $\mu\text{m}$  avec de la pâte diamant.

### **c) Mise en culture de cyanobactéries**

Des cultures enrichies en cyanobactéries ont été obtenues à partir d'échantillons de biofilms de l'aquarium 1. Ces échantillons ont été filtrés sur des filtres Millipore dont les pores font 3  $\mu\text{m}$  de diamètre, le filtrat obtenu a été utilisé à différents niveaux de dilution pour inoculer le milieu de culture. Le milieu utilisé est le BG11 (ATCC 616) préparé selon la recette de la collection de cyanobactéries de l'Institut Pasteur ([annexe 1](#)). Une solution de  $\text{SrCO}_3$  à  $2,10^{-8}\text{M}$  final et une de  $\text{BaCO}_3$  à  $4,10^{-9}\text{M}$  final ont été ajoutées au milieu classique BG11. Les cultures ont été placées dans une chambre à 25°C avec un éclairage de 16 h par jour. Une PCR pour amplifier le SSU rDNA des cyanobactéries des enrichissements a ensuite été réalisée avec les

amorces Cya106f-23S30R (Table 4) ciblant le groupe des cyanobactéries. La PCR a été réalisée dans un volume final de 25 µl contenant 15,6 µl d'eau ultrapure, 4 µl de tampon de réaction 5X (Promega, USA), 0,4 µl de dNTP à 20µM dans la réaction, 0,5 µL de chaque amorce à 0,4µM dans la réaction, 0,2 µl de GoTaq (5 U/µl) (Promega, USA) et 1 µL l'enrichissement. La réaction de PCR a été fait selon le programme suivant : dénaturation 2 minutes à 94 °C suivi de 35 cycles comprenant chacun une dénaturation de 15 secondes (94 °C), une phase d'hybridation de 30 secondes (55 °C) et une phase d'élongation de 2 minutes (72 °C) , suivis par une phase d'élongation finale de 7 minutes à 72 °C. Le produit de PCR a été séquencé directement dans le sens 3'-5' et dans le sens 5'-3'. Les contigs obtenus ont permis d'affilier les enrichissements par reconstruction phylogénétique, c'est-à-dire d'identifier précisément leur position au sein du phylum des cyanobactéries.

## II. Méthodes d'analyse

### A. Caractérisation de la diversité microbienne

#### 1. Extraction d'ADN

L'ADN a été extrait à partir de poudre broyée de microbialites dans un mortier en agate nettoyé à l'HCl 33%, rincé à l'eau distillée stérile et à l'éthanol entre chaque échantillon. 100 µl de poudre d'échantillon ont été placés dans un eppendorf. 100 µl de HCl 33% ont été ajoutés dans chaque tube afin de dissoudre les carbonates, 30 secondes plus tard 1 ml d'une solution PBS 0,5 X pH 7 / 0,5 mM EDTA pH 9 ont été ajouté afin de neutraliser l'attaque acide. Les échantillons ont ensuite été centrifugés 5 minutes à 12500 rpm. L'ADN a été extrait à partir du culot avec deux méthodes différentes :

- Le culot resuspendu dans 50µL de « lysis buffer » (fournit dans le kit QuickPick™gDNA) a été incubé 3 h à 56 °C avec 0,5µl de Proteinase K extra (20 mg/ml) et 1,5 µl de Viscozyme® (Sigma-Aldrich, Buchs, Switzerland). La Viscozyme® est un mélange d'enzymes hydrolytiques qui favorise la dégradation des exopolymères (EPS). L'ADN a ensuite été purifié avec le Kit QuickPick™gDNA (Bio-Nobile, Parainen, Finland) suivant les recommandations du fournisseur.

## MATÉRIEL&MÉTHODES

- Dans un second essai, le culot resuspendu dans la solution du « power bead tube » (fournit dans le kit MoBioPowerSoil DNA) a été incubé 1 h à 37 °C avec 2 µL de Viscozyme®. L'ADN a ensuite été purifié avec le kit MoBioPowerSoil DNA (MoBio, Carlsbad, CA, USA) selon les recommandations du fournisseur.

L'ADN extrait à partir de 100µl de poudre de microbialite a été repris dans 50µL de tampon d'élution.

Le premier protocole d'extraction a été utilisé pour la construction de la banque 1 et le second pour la banque 2 ainsi que la DGGE. La mesure de la quantité d'ADN par dosage des produits sur gel d'agarose a permis de conclure qu'avec ce type d'échantillons le second protocole faisant intervenir le kit MoBioPowerSoil avait un meilleur rendement d'extraction que le premier.

### **2. Clonage et séquençage du gène SSU rDNA**

Le SSUr DNA a été amplifié par PCR (polymerase chain reaction) avec différents couples d'amorces (Table 4) spécifiques pour chaque taxon ciblé. Les PCR ont été réalisées dans un volume final de 25 µl contenant 15,6 µl d'eau ultrapure, 4 µl de tampon de réaction 5X (Promega, USA), 0,4 µl de dNTP à 20µM dans la réaction, 0,5 µL de chaque amorce à 0,4 µM dans la réaction, 0,2 µl de GoTaq (5 U/µl) (Promega, USA) et 1 µl d'ADN. La réaction de PCR a été fait selon le programme suivant (annexe 2): dénaturation 2 minutes à 94 °C suivi de 35 cycles comprenant chacun une dénaturation de 15 secondes (94 °C), une phase d'hybridation de 30 secondes (55 °C) et une phase d'élongation de 2 minutes (72 °C) , suivi par une phase d'élongation finale de 7 minutes à 72 °C.

## MATÉRIEL&MÉTHODES

Nom	Spécificité	Sens	Longueur (bp)	Séquence	Tm (°C)
<b>B-27F</b>	Bactéries	Forward	20	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	56
<b>1492R</b>	Procaryotes	Reverse	19	GGTTACCTTGTTACGACTT	47
<b>CYA106F</b>	Cyanobactéries	Forward	22	CGGACGGGTGAGTAACGCGTGA	60
<b>23S30R</b>	Cyanobactéries	Reverse	22	CTTCGCCTCTGTGTGCCTAGGT	63
<b>21F</b>	Archées	Forward	20	TTCCGGTTGATCCTGCCGGA	68
<b>Ar109f</b>	Archées	Forward	20	AC (G/T) GCTGCTCAGTAACACGT	59
<b>W36</b>	Archées	Forward	16	TCCAGGCCCTACGGGG	61
<b>EK-82F</b>	Eucaryotes	Forward	17	GAAACTGCGAATGGCTC	53
<b>18S-1498R</b>	Eucaryotes	Reverse	20	CACCTACGGAAACCTTGTTA	53
<b>EK-1520R</b>	Eucaryotes	Reverse	16	CYGCAGGTTACCTAC	45
<b>UNonMet</b>	Protistes	Reverse	19	TTTAAGTTTCAGCCTTGCG	46
<b>341F-GC</b>	Bactéries	Forward	57	CGCCCGCCGCGCGCGGGCGGGCGGGG CGGGGGCACGGGGGGCCTACGGGAG GCAGCAG	85
<b>534R</b>	Bactéries	Reverse	17	ATTACCGCGGCTGCTGG	57

**Table 4 :** Amorces utilisées pour l'amplification et le séquençage du SSU rDNA

Les produits de PCR ont ensuite été clonés avec le kit de clonage TopoTA (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) en suivant les recommandations du fournisseur. Les colonies blanches ont été repiquées dans 50 µl de Tris 10 mM et l'insert a été ré-amplifié à partir de ce produit avec les amorces du vecteur T7/M13 suivant le même protocole de PCR que précédemment. Les inserts ont ensuite été séquencés partiellement (avec une seule amorce) ou entièrement (avec les deux amorces) par séquençage de type Sanger (BC Genomics). Les séquences ont ensuite été nettoyées, c'est-à-dire que les extrémités des séquences, souvent de mauvaise qualité ont été supprimées et que les positions ambiguës ont été vérifiées par lecture manuelle du chromatogramme de séquençage grâce au logiciel CodonCode aligner (CodonCode Corporation; [www.codoncode.com](http://www.codoncode.com)). Les séquences ont été assemblées en contigs (dans le cas des séquences entières) également avec le logiciel CodonCode aligner.

Des courbes de saturations qui expriment le taux de couverture de la banque par rapport à la diversité présente de l'échantillon ainsi que le calcul des indices de diversité Ace et Chao1 des différentes banques de clones ont été obtenues sur les jeux de séquences partielles grâce au logiciel DOTUR (*Schloss et al. 2005*)

### 3. Electrophorèse sur gel à gradient dénaturant (DGGE)

Le SSU rDNA des bactéries a aussi été amplifié pour permettre de séparer les différents amplicons par migration sur gel à gradient dénaturant et d'obtenir ainsi un profil de la diversité par échantillon. Pour cela une PCR a été réalisée en utilisant des amorces amplifiant une région courte (environ 200 bp) du SSU rDNA (Table 4). L'amorce forward contient un GCclamp qui permet aux amplicons de rester double brin pendant la migration. La réaction de PCR s'est faite dans un volume final d'environ 25 µl comprenant 19 µl d'eau ultrapure, 2,5 µl de tampon 10 X, les dNTP à 20 µM final, MgCl<sub>2</sub> à 3 mM final, chaque amorce à 0,3 µM final, 0,025 U/µl de Taq Platinum (Invitrogen) et 3 µl d'ADN. Le programme de PCR comprenait une phase initiale de dénaturation de 3 minutes à 94 °C, suivi de 10 cycles de polymérisation « Touch down » comprenant une dénaturation de 15 secondes à 94 °C, une hybridation de 30 s avec une température décroissante de 65 °C à 55 °C à chaque cycle, et une élongation de 2 min à 72 °C, suivi de 35 cycles identiques avec une température d'hybridation de 55°C, suivi finalement d'une élongation de 1 heure à 72 °C (annexe 3). La migration des produits de PCR a été faite avec un système DGGE-2000 (CBS Scientific Company). Le gel à 8 % en polyacrylamide, présente un gradient d'agent dénaturant allant de 30 % à 60 % d'agent dénaturant dans le gel. La solution 100% d'agent dénaturant correspondant à 7 M d'urée et 40 % de formamide. 10-15 µl de produit de PCR ont été chargés en haut du gel pour chaque échantillon et le gel a migré 6 heures à 150 V et à 60 °C, dans du tampon Tris-acetate-EDTA 0,5 X (1X: 40 mM Tris, 20 mM acide acétique, 1 mM EDTA, pH 8,0). Après l'électrophorèse, l'ADN dans les gels a été coloré au SYBR GOLD (Molecular Probes, Invitrogen, USA) et les gels visualisés et photographiés sous irradiation UV avec un transilluminateur UV muni d'un appareil photographique. Les photographies des gels sont ont été ensuite traitées et analysées avec le logiciel Bionumerics® (AppliedMaths, Belgique), et normalisés en se basant sur la position du marqueur de taille. Les bandes ont été assignées manuellement. Une matrice de distance basée sur la présence/absence des bandes (coefficient Jaccard (*Jaccard 1901*)) a permis l'analyse comparée des profils et leurs « clustering ».

#### 4. Reconstruction phylogénétique

Un jeu de séquences a été construit pour chaque domaine (bactéries, archées, eucaryotes). Chaque jeu de séquences a été aligné avec le logiciel MAFFT (*Katoh et al. 2002*). Nous avons réalisé des analyses phylogénétiques préliminaires en utilisant une méthode de distance (NJ, *neighbor-joining*) à partir du jeu de séquences avec l'ensemble de logiciels MUST (*Philippe 1993*). A partir des arbres préliminaires obtenus, nous avons choisi un contig représentatif par OTUs (Operational Taxonomic Units). Les OTUs ont été définis comme des groupes de séquences de SSU rDNA partageant plus de 97% d'identité. Ces séquences ont ensuite été réalignées avec des séquences de référence d'espèces cultivées ainsi que les séquences des plus proches représentants non-cultivés identifiés dans GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) par BLAST (*Altschul et al. 1997*). Des analyses phylogénétiques par maximum de vraisemblance ont été ensuite réalisées en utilisant des positions alignées sans ambiguïté (environ 1000 nt par alignement) avec le logiciel TREEFINDER (*Jobb et al. 2004*). La reconstruction phylogénétique a été faite suivant un modèle GTR (General Time Reversible) d'évolution de séquences avec une loi gamma pour tenir compte des différences de vitesse d'évolution entre sites et 4 catégories de sites plus des sites invariables. Le support statistique des nœuds a été estimé en utilisant la méthode de bootstrap avec 1000 réplicats. Les arbres obtenus ont été visualisés avec le logiciel FIGTREE (*Rambaut 2009*).

### B. Microscopies et spectroscopies : caractérisation des assemblages minéraux-microorganismes

#### 1. Diffraction des rayons X

La diffraction des rayons X a été réalisée sur les échantillons (Table 3) finement broyés dans un mortier en agate avec de l'éthanol à 100 %. Les mesures ont été réalisées sur un diffractomètre Panalytical Xpert à anode de cobalt équipé d'un monochromateur, en configuration Bragg Brentano.

#### 2. Imagerie plein champ, à épifluorescence et confocale

Les échantillons ont été observés avec un microscope droit Zeiss Axioplan 2 à épifluorescence ainsi qu'avec un microscope droit Leica DM6000B LT à épifluorescence équipé d'une caméra noir&blanc Leica DFC340FX. Les observations au microscope confocal

ont été réalisées en collaboration avec Emmanuelle Gérard (GAP-IPGP) sur un microscope confocal à balayage laser FluoView<sup>TM</sup> FV1000 (Olympus). Celui-ci est équipé d'une diode laser (405 nm), d'un laser multi-argon (458 nm, 488 nm et 515 nm), d'un laser hélium-néon vert (534 nm) et d'un laser hélium-néon rouge (633 nm). Les longueurs d'ondes utilisées pour l'excitation lors de l'acquisition d'image sont 405 nm, 488 nm et 543 nm ; la fluorescence émise est collectée respectivement entre 425-475 nm, 500-530 nm et 560-660 nm. Ce microscope est également capable de faire de l'acquisition spectrale ; dans ce cas, l'échantillon est illuminé successivement par les lasers (405, 488, 536, 633) et la fluorescence émise est collectée avec des fenêtres de 10 nm avec un pas de 5 nm. On obtient ainsi un spectre d'émission avec une résolution spectrale de 5 nm.

### **3. Microscope électronique à balayage (SEM) et spectroscopie EDX (*Energy-dispersive X-ray spectroscopy*)**

Avant l'observation au microscope électronique à balayage, les échantillons ont été métallisés au carbone ou avec un mélange or-palladium. Le microscope utilisé est un Zeiss Ultra 55 FEG équipé d'un détecteur InLens, d'un détecteur dédié aux électrons secondaire (SE2) et d'un détecteur dédié aux électrons retro-diffusés (AsB). Pour l'imagerie les électrons sont typiquement accélérés à 10 kV, on choisit un diaphragme de 30 µm et une distance de travail comprise entre 2 et 7 mm. Le microscope est également équipé d'un détecteur EDX QUANTAX (X-ray Energy dispersive spectroscopy) permettant de réaliser des cartographies semi-quantitatives de la composition chimique élémentaire. Celles-ci ont été réalisées après calibration au cuivre avec la bibliothèque de références selon la méthode  $\phi\rho z$ . Lors des analyses EDX, le microscope opérait à 20 kV avec le diaphragme de 60 µm à une distance de travail de 7,5 mm. Le logiciel ESPRIT 1.8 a permis l'acquisition et le traitement des données EDX.

### **4. Couplage SEM et CLSM (*Confocal laser scanning microscopy*)**

Les échantillons de microbialites inclus dans la LR-white ont d'abord été observés au microscope confocal puis au microscope électronique à balayage. La résine LR-white n'est pas fluorescente ; cela permet d'observer les microorganismes naturellement fluorescents ainsi que ceux marqués par les colorations (DAPI-Calcein). Après métallisation, les mêmes zones ont pu être observées au SEM. Cette approche permet en superposant les images obtenues d'avoir au même endroit une information sur les microorganismes présents et leur

répartition ainsi qu'une information sur la minéralogie et la distribution des phases minérales avec la résolution spatiale du SEM.

Le couplage SEM-CLSM s'est avéré très efficace pour mieux comprendre les relations entre microorganismes et minéraux ; son utilisation a été étendue à des cellules en culture simplement déposées sur lame de verre.

### **5. Préparation d'échantillons par FIB (*Focused Ion Beam*)**

Des lames FIB qui sont des sections ultra-fines (~100 nm d'épaisseur) prélevées dans un échantillon ont été préparées avec un microscope dual FIB-NEON 40EsB. Cette étape a été réalisée grâce au support technique d'Imène Estève (IMPMC-UPMC). Le microscope permet d'imager la zone à couper grâce à la fonction microscope électronique à balayage, de creuser grâce au faisceau d'ion  $\text{Ga}^+$  focalisé sur la zone et d'extraire la lame excavée par micromanipulation *in situ*. Pour plus de détails voir *Heaney et al. (2001)*. Le canon ionique opère à 30 kV et ~5 nA au départ pour creuser, puis l'intensité a été réduite à 100 pA lors de la phase d'amincissement de la lame. Les lames FIB produites font environ 15  $\mu\text{m}$  de long, 6  $\mu\text{m}$  de profondeur et 100-200 nm d'épaisseur ; elles sont ainsi transparentes aux électrons au TEM.

### **6. Microscope électronique à transmission et diffraction électronique (SAED)**

La microscopie électronique en transmission a été réalisée sur un microscope JEOL2100F équipé d'un canon à émission de champ accélérant les électrons à 200 kV et d'une pièce polaire haute résolution (UHR). L'acquisition des images est assurée par une caméra CCD US4000 GATAN. La diffraction électronique avec sélection d'aire (SAED) a été faite avec le plus petit diaphragme c'est-à-dire sur une surface de 100 x 100 nm<sup>2</sup>.

### **7. Spectro-microscopie d'absorption des rayons X, STXM (Scanning transmission X-ray microscopy)**

La spectro-microscopie d'absorption des rayons X a été réalisée sur les lignes STXM 11.0.2.2 et 5.3.2.2 du synchrotron ALS (Advanced Light Source, Berkeley, USA). Les acquisitions ont été réalisées aux seuils K du carbone, de l'oxygène et de l'azote et aux seuils  $L_{2,3}$  du calcium suivant la procédure décrite par *Bluhm et al. (2006)*. L'anneau de stockage de l'ALS fonctionne à 1,9 GeV à un courant de 500 mA. La calibration pour le seuil K du carbone a été réalisée en utilisant la transition 3p de Rydberg du  $\text{CO}_2$  gazeux à 294.96 eV; pour le calcium,



c'est le pic  $L_3$  de la calcite à 349.3 eV qui a permis la calibration (*Rieger et al. 1986*). Les données STXM permettent d'obtenir des informations sur l'environnement atomique local (spéciation) de l'élément considéré avec une bonne résolution spectrale (0,1 eV) tout en conservant l'information spatiale sur la distribution de ces groupements (résolution spatiale minimale de 25 nm). Les données sont traitées grâce au logiciel aXis2000. Par exemple au seuil K du carbone, on peut distinguer les groupements carbonates et les différents groupements associés à la matière organique et les cartographier finement. Des exemples de données STXM en science de la Terre sont disponibles (*Benzerara et al. 2004; Benzerara et al. 2006 et Obst et al. 2009; Bernard et al. 2010*).

### **C. Suivi de la chimie des aquariums**

La chimie de l'eau des aquariums a été suivie par mesures régulières du pH et de la température. L'eau a de plus été prélevée environ tous les deux mois et a été analysée par le Service d'Analyse des Roches et des Minéraux (SARM) à Nancy. La concentration en ions majeurs a été obtenue par ICP OES (*Inductively coupled plasma optical emission spectrometry*) sur Icap 6500 Thermo Scientific ; la concentration des ions mineurs a été mesurée par ICP MS (*Inductively coupled plasma mass spectrometry*) sur Elan 6000 Perkin Elmer. Les échantillons ont été préparés suivant la méthode exposée dans l'article suivant : *Carignan et al. 2001*.

## CHAPITRE 1

### Description générale des microbialites d'Alchichica : minéralogie et diversité microbienne

« Il y a bien un domaine de la connaissance du physique et un domaine de la connaissance du vivant; mais il n'y a pas de la même façon un domaine réel du physique et un domaine réel du vivant, séparés par une certaine frontière également réelle; c'est selon les structures et les fonctions que le physique et le vital sont distincts, sans êtres séparés selon le réel substantiel. [...] vie et matière non vivante peuvent en un certain sens être traitées comme deux vitesses d'évolution du réel. »

*Gilbert Simondon, L'individu et sa genèse physico-biologique p279. Ed. Jérôme Millon 1995*

## CHAPITRE 1

Cette première partie a pour but de présenter le système d'étude que sont les microbialites du lac d'Alchichica. Ceci constitue le cadre nécessaire à l'étude ultérieure des relations potentielles entre minéraux et microorganismes.

Dans un premier temps je décrirai donc la minéralogie globale du système, puis le corps de cette partie sera consacré à la description et à l'analyse de la diversité microbienne qui a fait l'objet d'une publication dans le journal PLoS ONE (Chapitre I, III, Manuscrit 1).

# I. Minéralogie des microbialites d'Alchichica

## A. Aragonite et hydromagnésite

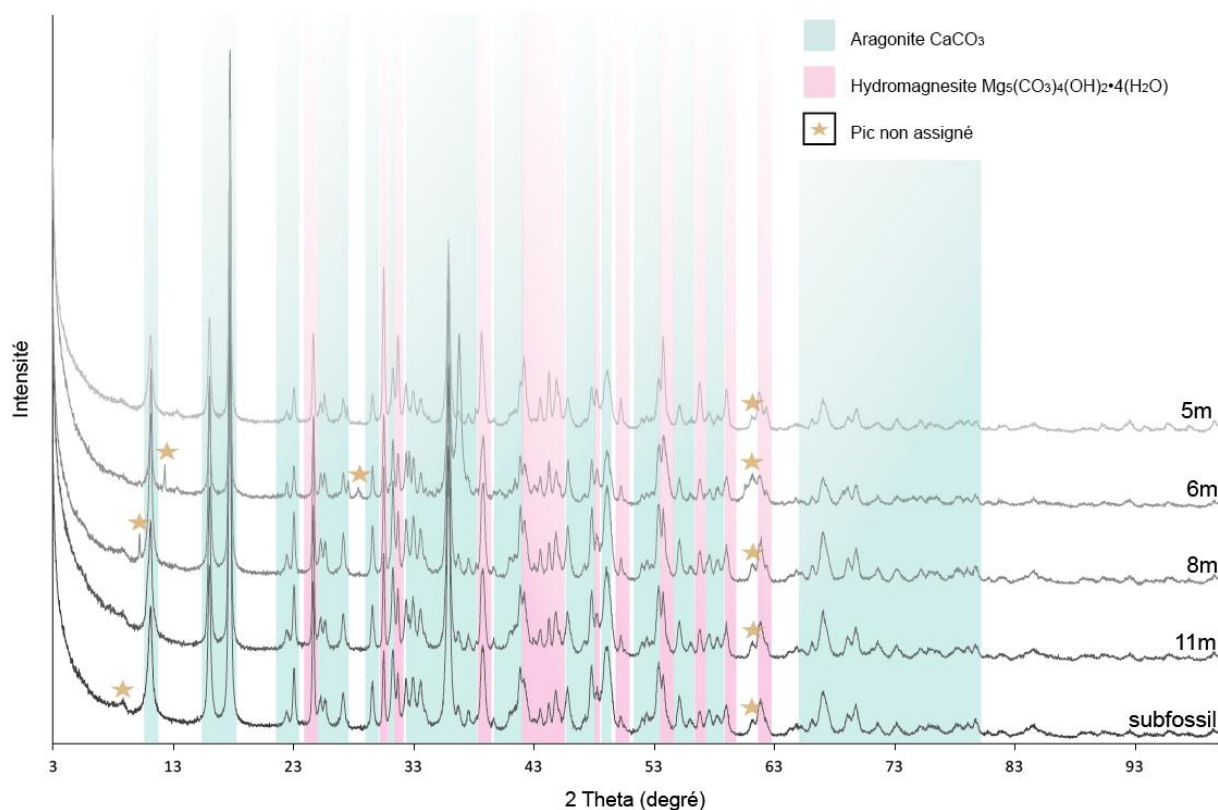
Afin de déterminer les phases minérales formant les microbialites d'Alchichica, nous avons réalisé des analyses de diffraction des rayons X sur poudre à partir de différents échantillons prélevés selon un profil de profondeur dans le lac (Figure 8). Cette analyse révèle que les microbialites sont constitués majoritairement d'un carbonate de calcium, l'aragonite ( $\text{CaCO}_3$ ) et d'un carbonate de magnésium hydraté, l'hydromagnésite ( $\text{Mg}_5(\text{CO}_3)_4(\text{OH})_2 \cdot 4(\text{H}_2\text{O})$ ). La composition varie très peu avec la profondeur du lac. Quelques pics n'ont pas pu être assignés dans le diagramme, ils représentent des phases mineures qui n'ont pas été détectées dans tous les échantillons.

Cette analyse est cohérente avec les valeurs d'indice de saturation calculées à partir de la chimie de l'eau du lac. En effet l'hydromagnésite et l'aragonite sont sursaturés à  $\text{SI}^2 = +0,68$  et  $\text{SI} = +0,9$  respectivement (Każmierczak *et al.* 2011). Il est à noter que l'eau du lac est sursaturée vis-à-vis d'autres carbonates magnésiens tels que la huntite et la magnésite mais ils ne se forment pas ici vraisemblablement pour des raisons cinétiques.

---

<sup>2</sup> SI : Saturation index (cf. Introduction 2.B.1)

## CHAPITRE 1



**Figure 8 :** Diffractogrammes de poudres (rayons X) réalisés sur des échantillons de microbialites du lac d'Alchichica. Les échantillons ont été prélevés à 5, 6, 8 et 11m dans le lac. Un échantillon sec à l'extérieur du lac (subfossile) a également été analysé. Les pics indexés en bleu sont attribués à l'hydromagnésite, ceux en rose à l'aragonite. Quelques pics n'ont pas pu être indexés, ils sont indiqués par une étoile marron.

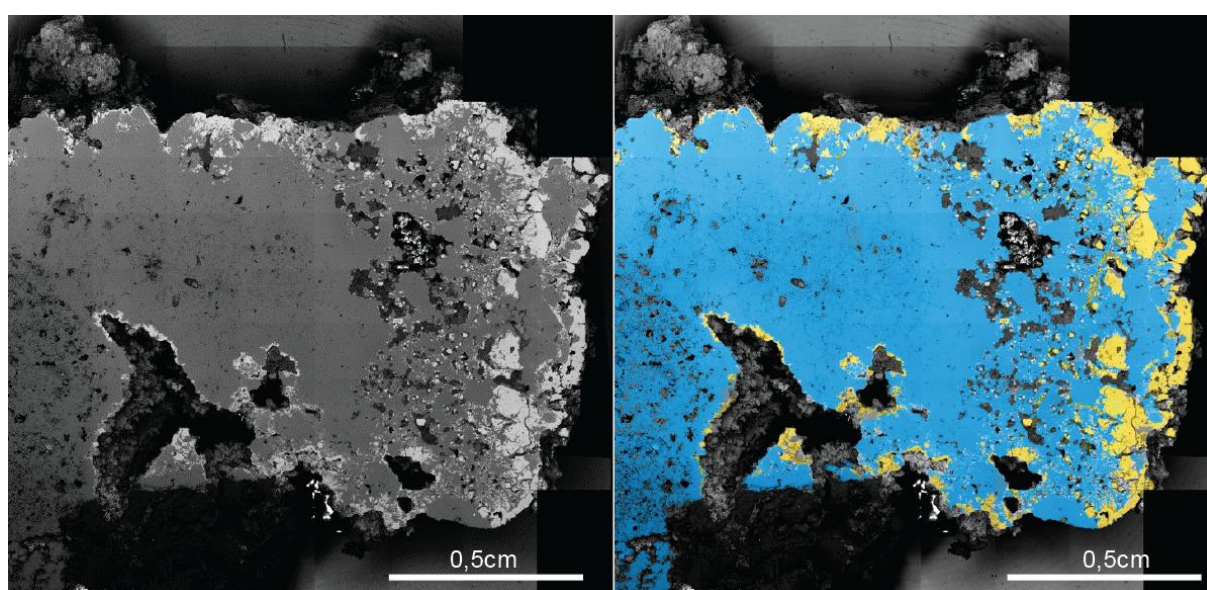
### B. Distribution spatiale des phases minérales

Pour aller plus loin dans cette description minéralogique d'ensemble, nous nous sommes attachés à regarder la distribution des deux phases majoritaires, l'une porteuse de calcium (aragonite) et l'autre porteuse de magnésium (hydromagnésite), grâce à la microscopie électronique à balayage couplée à l'analyse EDX.

Cette analyse a permis de montrer que la phase majoritaire est l'hydromagnésite. La distribution de l'aragonite est en général périphérique alors que la masse du microbialite est en hydromagnésite (e.g Figure 9). La distribution de l'aragonite à cette échelle pourrait laisser supposer qu'il s'agit d'une phase transitoire. Il a notamment été montré dans le cas des stromatolites du lac Walyungup qu'un remplacement de l'aragonite biogénique par l'hydromagnésite était possible (Coshell et al. 1998). Cette hypothèse a également été

## CHAPITRE 1

avancée dans le cas des microbialites d'Alchichica (*Kaźmierczak et al. 2011*), où il est proposé que la phase primaire serait l'aragonite qui, par un remplacement diagénétique, donnerait l'hydromagnésite (*Kaźmierczak et al. 2011*). Cependant il a été montré dans le cas des microbialites du lac Salda Golü que l'hydromagnésite qui les forme est primaire. Sa précipitation serait induite *in situ* par l'activité microbienne. (*Braithwaite et al. 1994*). Dans le cas des microbialites d'Alchichica une étude texturale à plus fine échelle est nécessaire pour comprendre la relation génétique entre les deux phases si elle existe. Des éléments de réponse sont présentés dans le Chapitre 2.



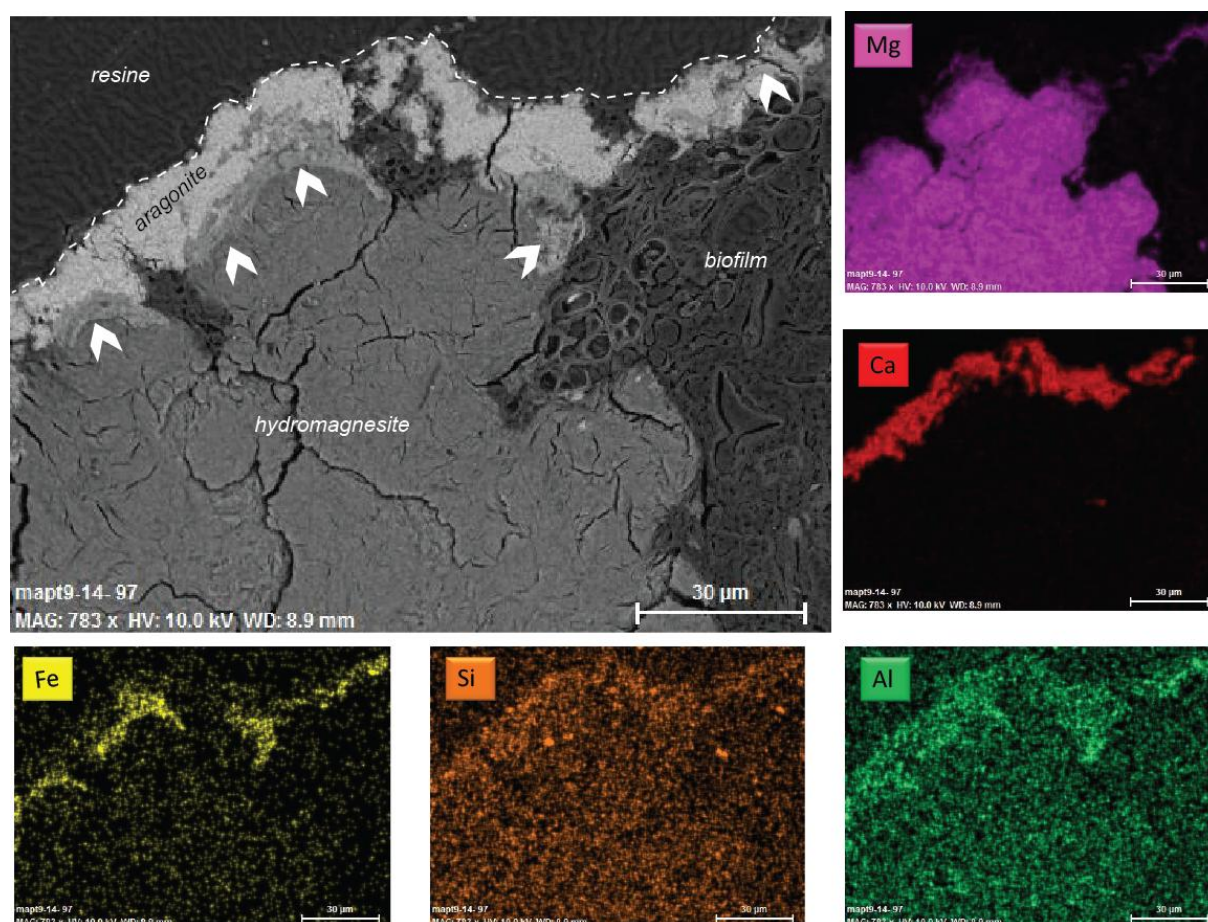
**Figure 9 :** Vue panoramique d'une surface polie d'un échantillon centimétrique de microbialite d'Alchichica (AL51, non-inclus) au SEM en mode électron rétrodiffusés (AsB). L'image à gauche est non traitée, sur l'image de droite des fausses couleurs ont été ajoutées qui permettent de mettre en évidence la distribution des deux phases minérales majeures à cette échelle. L'aragonite a été colorée en jaune et l'hydromagnésite en bleu.

Par ailleurs une analyse plus fine de certaines zones a permis de mettre en évidence qu'il existe une autre phase minérale très minoritaire en général distribuée à l'interface entre l'aragonite externe et l'hydromagnésite. Cette phase est porteuse de Mg, Si, Fe et parfois Al (**Figure 10**). Le même genre de phase a déjà été décrit dans des microbialites modernes carbonatés. C'est le cas dans les microbialites de Satonda (*Benzerara et al. 2010*) ainsi que dans les caves basaltiques d'Hawaï (*Leveille et al. 2000*). Dans ces deux exemples un silicate riche en magnésium a été observé formant des lamines en alternance avec un carbonate de calcium (calcite ou aragonite). Ce type de phase a également été observé dans des



## CHAPITRE 1

stromatolites fossiles en phosphate (francolite) (*Sanchez-Navas et al. 1998*). Il s'agissait cette fois-ci d'un silicate de Fe-Al plus ou moins amorphe dont l'agencement textural avec les phases adjacente a mené les auteurs à proposer que cette phase se serait formée de façon synsédimentaire en relation avec l'activité bactérienne (*Sanchez-Navas et al. 1998*). On peut alors s'interroger sur l'origine de cette phase dans le cas des microbialites d'Alchichica, si elle est liée à l'activité microbienne ou pourrait-elle correspondre à un changement transitoire des conditions du milieu ? La question de la formation d'une phase silicatée dans les microbialites d'Alchichica sera de nouveau évoquée dans l'étude de l'échantillon AL10 Chapitre 2-III-C.

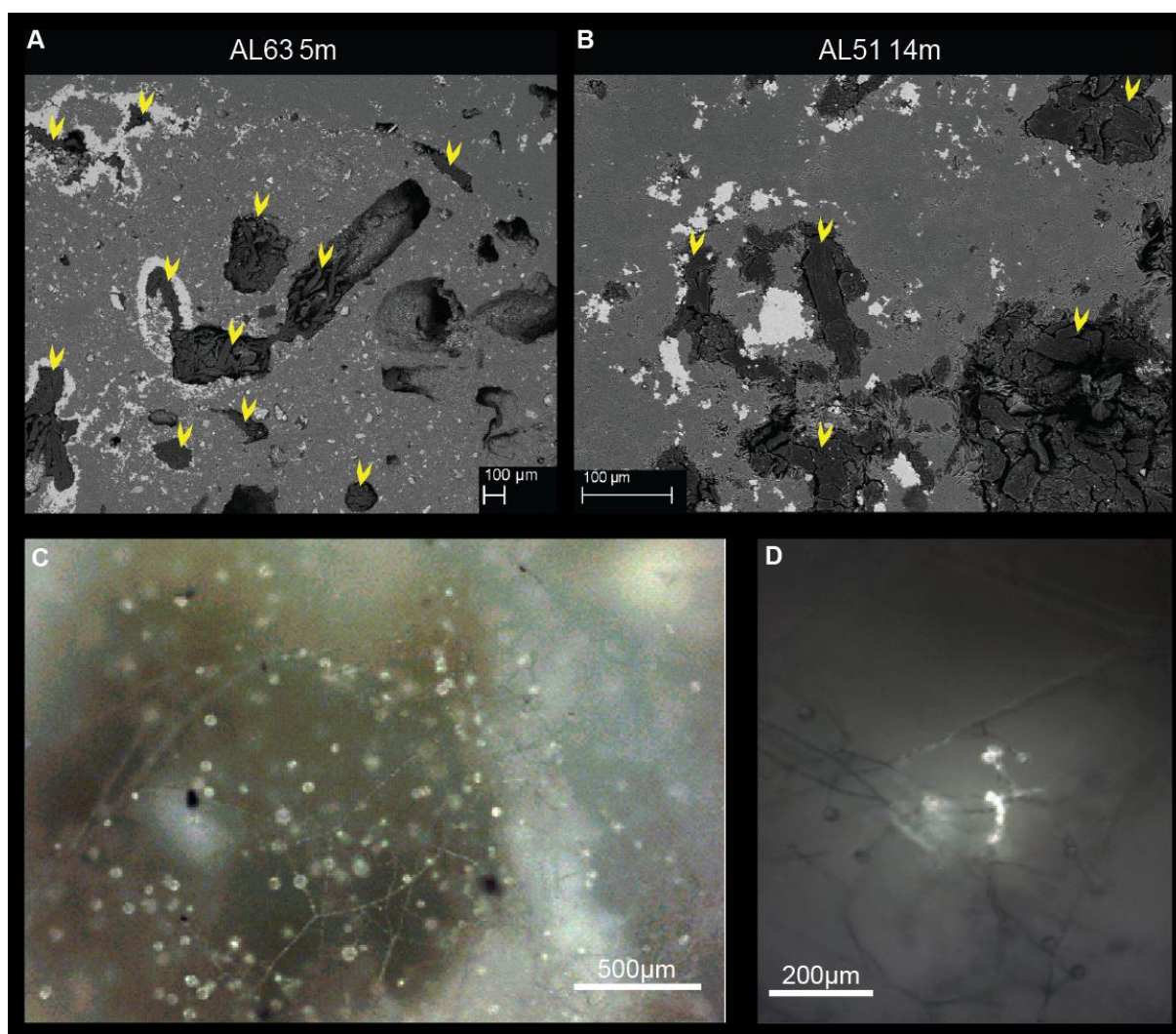


**Figure 10 :** Image en SEM (mode électrons secondaires) d'un échantillon de microbialite prélevé à 4m de profondeur (AL66) et cartographies élémentaires correspondantes. L'échantillon a été inclus dans une résine (LR white) puis poli, la limite entre la résine et la périphérie de l'échantillon est matérialisée par une ligne pointillée sur l'image de SEM. L'inclusion préserve l'interface avec le biofilm. Le mode d'imagerie SEM permet de distinguer les deux phases majoritaires, l'aragonite phase porteuse de calcium apparaît blanche alors que l'hydromagnésite porteuse de magnésium est gris clair. Ceci est confirmé par les cartographies EDX. Une troisième phase avec un contraste intermédiaire est visible sur l'image SEM (flèches blanches), cette phase n'a pas été identifiée mais elle est porteuse de Fe, Mg, Al et Si.

### C. Présence d'organismes endolithiques

Nous avons observé, sur les surfaces polies des échantillons d'Alchichica, la présence de filaments de 20µm de diamètre environ qui s'associent entre eux et forment des galeries dans l'hydromagnésite (Figure 11). Les surfaces polies ont été réalisées entre 0,5 cm et 1 cm en dessous de la surface de l'échantillon, ce sont donc des organismes endolithiques. De plus nous avons observé une association préférentielle de ces filaments avec l'aragonite. En effet, le centre des échantillons est dominé par l'hydromagnésite et l'aragonite semble associée à ces organismes endolithiques, bordant les ensembles de filaments (Figure 11-A).

Nous n'avons pas été plus loin dans la caractérisation de ces organismes endolithiques néanmoins il serait intéressant de caractériser plus précisément leur relation avec l'aragonite. En effet il a été montré que l'activité des organismes endolithiques pouvait induire la précipitation de nouvelles phases minérales. C'est notamment le cas de la cyanobactérie endolithique *Solentia* dont l'activité de micro-forage conduit à la précipitation d'aragonite fibreuse formant une couche micritique autour des particules détritiques de la matrice (Macintyre et al. 2000). Dans ce cas l'activité de micro-forage contribue à stabiliser le stromatolite en soudant les particules adjacentes les unes aux autres (Reid et al. 2000a; Reid et al. 2000b). L'activité endolithique peut également contribuer à déstabiliser le système en créant des galeries qui la fragilisent, c'est le cas par exemple des champignons endolithiques associés aux coraux, en général considérés comme des pathogènes (Golubic et al. 2005). Ici la taille des filaments fait plutôt pencher pour des organismes eucaryotes, de plus l'observation sous la surface en lumière réfléchie de formes filamenteuses qui relient des protubérances nous mène à proposer qu'il s'agit d'hyphes fongiques (Figure 11). La nature exacte de ces organismes endolithiques et leur rôle dans la diagénèse des microbialites d'Alchichica sera à préciser par l'acquisition de données supplémentaires.



**Figure 11 :** (A) et (B) Images SEM (mode AsB) des surfaces polies des échantillons AL63 (5m) et AL51 (14m). Le contraste correspond au contraste chimique, la phase en blanc est l'aragonite, la phase gris-clair, l'hydromagnésite. La présence de microorganismes endolithiques filamenteux est indiquée par les flèches jaunes. (C) et (D) Images de microscopie optique en lumière réfléchie de la surface polie de AL57 (8m). On voit par transparence sous la surface du minéral des structures filamenteuses.



## II. Résumé de l'article n°1

### **« Structures des communautés procaryotes et eucaryotes dans des échantillons de terrain et cultivés de microbialites du lac d'Alchichica (Mexique) »**

#### **A. Contexte & Objectifs**

Cette partie s'inscrit dans le contexte des études de diversité microbienne associée aux microbialites actuels (Introduction II-A-b). Les auteurs travaillant sur les stromatolites marins actuels ont mis en lumière la question de l'importance relative de certains groupes fonctionnels de microorganismes (en particulier ceux capables de faire la photosynthèse ou la sulfato-réduction) dans la précipitation de carbonate et l'accrétion des microbialites. Dans ce cadre, nous avons cherché à identifier les groupes fonctionnels de microorganismes présents dans les microbialites d'Alchichica pour savoir si le modèle de formation des stromatolites de milieux marins pourrait fournir une hypothèse de travail raisonnable dans notre cas.

Cette étude a été menée sur des échantillons de microbialites prélevés à différentes profondeurs du lac d'Alchichica (entre 0 m et 14 m). Ceci nous a permis en plus de nous interroger sur l'évolution des communautés microbiennes avec la profondeur.

Un dernier point important était d'évaluer parallèlement la diversité microbienne dans les microbialites maintenus en culture en aquarium au laboratoire pour valider ou invalider la pertinence de leur utilisation ultérieure comme analogues des microbialites de terrain.

Notre démarche a été de décrire la diversité microbienne en alliant des méthodes ne faisant pas intervenir la culture des microorganismes (Matériel et Méthodes II-A-2 et II-A-3). Le fait de décrire en parallèle la diversité des organismes appartenant aux trois domaines du vivant est une démarche qui avait rarement été conduite pour les microbialites et uniquement dans le cas de stromatolites marins (*Papineau et al. 2005; Allen et al. 2009*) avec des résultats peu concluant dans le cas des eucaryotes.

## B. Principaux résultats & Éléments de discussion

Notre étude a révélé une grande diversité des domaines bactérien (344 phylotypes<sup>3</sup> répartis dans 21 phylums ([annexe 4](#))) et eucaryote (58 phylotypes répartis dans 9 phylums ([annexe 5](#))) relativement à celle des archées (2 phylotypes ([annexe 6](#))).

La diversité des bactéries est dominée par les alphaproteobactéries et les cyanobactéries. On trouve une grande diversité de types métaboliques : les photosynthétiques oxygéniques (Cyanobacteria), anoxygénique (certains membres des Alphaproteobacteria, Chloroflexi), mais aussi beaucoup d'hétérotrophes spécialisés dans la dégradation de molécules organiques complexes (Verrucomicrobia, Planctomycetales). Quelques séquences ont pu être attribuées à des Deltaproteobacteria et Firmicutes réalisant la sulfato-réduction, néanmoins elles sont très minoritaires.

Le modèle de biominéralisation basé sur les métabolismes bactériens putatifs présents dans les microbialites d'Alchichica est au premier ordre compatible avec celui proposé aux Bahamas. La biominéralisation serait le résultat net d'une balance entre les métabolismes favorisant la précipitation des carbonates (photosynthèse oxygénique et sulfato-réduction) et ceux favorisant leur dissolution (respiration et fermentation) (*Dupraz et al. 2005*). Cependant il faut ajouter parmi les métabolismes favorisant la précipitation de minéraux carbonatés le rôle sans doute important de la photosynthèse anoxygénique (*Bosak et al. 2007*). En effet notre étude a révélé que les organismes capables de faire ce métabolisme sont potentiellement abondants dans les microbialites d'Alchichica, en particulier les Chloroflexi. Ensuite, l'abondance des hétérotrophes capables de dégrader les grandes molécules organiques nous permet de formuler l'hypothèse que ces microorganismes seraient des intermédiaires dans la dégradation des EPS. La production de molécules organiques de plus petite taille associée à leur activité, augmenterait l'activité des bactéries sulfato-réductrices. Or la sulfato-réduction favorise la précipitation de carbonate. Ceci est cependant à mettre en regard du fait que les bactéries sulfato-réductrices sont peu abondantes ici (car peu détectées dans notre analyse) ici et leur contribution à la précipitation des carbonates est sans doute moindre que ce qui a été proposé dans le cas des stromatolites des Bahamas (*Baumgartner et al. 2006*).

---

<sup>3</sup> Phylotype est synonyme d' OTU, ce terme est utilisé comme un proxy du terme espèce. Un phylotype regroupe des individus qui partagent 97% ou plus de similarité au niveau de la séquence du SSU rDNA.

## CHAPITRE 1

La diversité des eucaryotes est dominée par les Chlorophyta (plus particulièrement une Ulvophyceae unicellulaire), les Stramenopila (plus particulièrement les diatomées), les Alveolata (plus particulièrement les ciliés) et les Fungi (en particulier les Rozellida, un groupe basal de champignons parasitiques mal connu bien que très commun en eau douce (*Lara et al. 2010; Jones et al. 2011*)). La diversité révélée par cette étude est bien supérieure à ce qui avait été observé jusqu'à présent dans les biofilms associés aux microbialites. Le rôle des protistes a donc vraisemblablement été sous-estimé jusqu'ici. En effet certains sont impliqués directement dans la biominéralisation par la production de squelettes (par exemple les diatomées), d'autres pourraient induire la précipitation de carbonate en relation avec l'alcalinisation du milieu lors de la photosynthèse. Le rôle des protistes dans le réseau trophique, en particulier comme prédateurs des populations bactériennes (par exemple les ciliés) ou comme parasites est également un paramètre important qui pourrait permettre de mieux comprendre la dynamique des populations microbiennes. Enfin certains champignons pourraient avoir une activité endolithique qui déstabiliserait le système mais pourrait également contribuer à la formation de nouvelles phases minérales diagénétiques (*Golubic et al. 2005*). Le rôle potentiel des protistes est donc à ajouter au modèle métabolico-géochimique de formation des microbialites (*Dupraz et al. 2005*) proposé pour les microbialites des Bahamas pour augmenter la validité de l'hypothèse présentée par celui-ci.

L'étude de la structuration des communautés microbiennes en fonction de la profondeur d'échantillonnage dans le lac a montré qu'il n'y avait pas de signal fort de changements des communautés avec la profondeur à l'échelle des phylums. Il faut donc se placer à une échelle phylogénétique plus fine pour aborder cette question. Une différence marquante est alors le shift dans l'abondance relative des différents ordres de cyanobactéries. En effet les Oscillatoriales dominent les échantillons de surface alors qu'en profondeur (à partir de 8 m) ce sont les Pleurocapsales qui dominent. Ce changement pourrait être lié au fait que les Oscillatoriales sont plus adaptées à des conditions de forte illumination (*Van der Grinten et al. 2005*) alors que les Pleurocapsales, le sont aux conditions de faible illumination (*Waterbury et al. 1978*).

Les communautés en culture sont toujours très diverses dans les aquariums après 2 ans de culture, leur diversité en terme de nombre de phylotypes est même supérieure à celle des échantillons naturels. Ceci est peut-être lié à la présence de conditions favorables sans cyclicité climatique qui auraient permis, dans les aquariums, à une diversité plus grande de s'exprimer de façon simultanée. La comparaison des communautés cultivées en aquarium et

## CHAPITRE 1

des communautés naturelles montre que les échantillons maintenus en aquariums ont évolué mais que tous les groupes fonctionnels majeurs de microorganismes ont été maintenus. Il est donc envisageable d'utiliser les aquariums comme analogues des échantillons de terrain pour mettre en place des expériences visant à valider le modèle hypothétique établi ici quant à la formation des microbialites d'Alchichica.

### III. Manuscrit de l'article n°1

**“Prokaryotic and Eukaryotic Community Structure in  
Field and Cultured Microbialites from the Alkaline Lake  
Alchichica (Mexico)”**

( *PLoS ONE* 6(12): e28767 (2011))

# Prokaryotic and Eukaryotic Community Structure in Field and Cultured Microbialites from the Alkaline Lake Alchichica (Mexico)

Estelle Couradeau<sup>1,2,3</sup>, Karim Benzerara<sup>2</sup>, David Moreira<sup>1</sup>, Emmanuelle Gérard<sup>3</sup>, Józef Kaźmierczak<sup>4</sup>, Rosaluz Tavera<sup>5</sup>, Purificación López-García<sup>1\*</sup>

**1** Unité d'Ecologie, Systématique et Evolution, CNRS UMR 8079, Université Paris-Sud, Orsay, France, **2** Institut de Minéralogie et de Physique des Milieux Condensés, CNRS UMR 7590, Université Pierre et Marie Curie, Paris, France, **3** Institut de Physique du Globe de Paris, CNRS UMR 7154, Université Paris Diderot, Paris, France, **4** Institute of Paleobiology, Polish Academy of Sciences, Warszawa, Poland, **5** Departamento de Ecología y Recursos Naturales, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, Distrito Federal, Mexico

## Abstract

The geomicrobiology of crater lake microbialites remains largely unknown despite their evolutionary interest due to their resemblance to some Archaean analogs in the dominance of in situ carbonate precipitation over accretion. Here, we studied the diversity of archaea, bacteria and protists in microbialites of the alkaline Lake Alchichica from both field samples collected along a depth gradient (0–14 m depth) and long-term-maintained laboratory aquaria. Using small subunit (SSU) rRNA gene libraries and fingerprinting methods, we detected a wide diversity of bacteria and protists contrasting with a minor fraction of archaea. Oxygenic photosynthesizers were dominated by cyanobacteria, green algae and diatoms. Cyanobacterial diversity varied with depth, Oscillatoriales dominating shallow and intermediate microbialites and Pleurocapsales the deepest samples. The early-branching Gloeobacterales represented significant proportions in aquaria microbialites. Anoxygenic photosynthesizers were also diverse, comprising members of Alphaproteobacteria and Chloroflexi. Although photosynthetic microorganisms dominated in biomass, heterotrophic lineages were more diverse. We detected members of up to 21 bacterial phyla or candidate divisions, including lineages possibly involved in microbialite formation, such as sulfate-reducing Deltaproteobacteria but also Firmicutes and very diverse taxa likely able to degrade complex polymeric substances, such as Planctomycetales, Bacteroidetes and Verrucomicrobia. Heterotrophic eukaryotes were dominated by Fungi (including members of the basal Rozellida or Cryptomycota), Choanoflagellida, Nucleariida, Amoebozoa, Alveolata and Stramenopiles. The diversity and relative abundance of many eukaryotic lineages suggest an unforeseen role for protists in microbialite ecology. Many lineages from lake microbialites were successfully maintained in aquaria. Interestingly, the diversity detected in aquarium microbialites was higher than in field samples, possibly due to more stable and favorable laboratory conditions. The maintenance of highly diverse natural microbialites in laboratory aquaria holds promise to study the role of different metabolisms in the formation of these structures under controlled conditions.

**Citation:** Couradeau E, Benzerara K, Moreira D, Gérard E, Kaźmierczak J, et al. (2011) Prokaryotic and Eukaryotic Community Structure in Field and Cultured Microbialites from the Alkaline Lake Alchichica (Mexico). PLoS ONE 6(12): e28767. doi:10.1371/journal.pone.0028767

**Editor:** Jack Anthony Gilbert, Argonne National Laboratory, United States of America

**Received:** September 13, 2011; **Accepted:** November 14, 2011; **Published:** December 14, 2011

**Copyright:** © 2011 Couradeau et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Funding:** This project was financed by the French Centre National de la Recherche Scientifique - CNRS Interdisciplinary program "Origines des planètes et de la vie" (PID OPV) and Institut National des Sciences de l'Univers - INSU program "InteractionsTerre/Vie" (InterrVie), and the Polish Ministry of Science and Higher Education grant N307019. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

**Competing Interests:** Purificación Lopez-Garcia is an Academic Editor of PLoS ONE. This does not alter the authors' adherence to all the PLoS ONE policies on sharing data and materials.

\* E-mail: puri.lopez@u-psud.fr

## Introduction

Microbialites are organosedimentary structures formed by microbially-mediated mineral precipitation and/or accretion [1]. Stromatolites are microbialites exhibiting a laminated macrofabric [2]. Their fossils are found throughout the geological record [3,4], the oldest being 3,43 Ga old (Pilbara Craton, Western Australia) [5]. After having dominated the Precambrian, stromatolite abundance declined steeply at the onset of the Phanerozoic [6,7]. Today, stromatolites are confined to very few marine or quasi-marine environments, such as the well-studied Shark Bay, Australia [8,9] and Exuma Sound, Bahamas [10,11]. Microbialites have also been described in alkaline lakes such as Lake Van,

Turkey [12,13], Pyramid Lake, USA [14], the Indonesian crater lakes Satonda [15,16,17] and Niuafou'u [18], but also in the freshwater Ruidera pools [19] and the hypersaline lakes Lago Vermelha, Brazil [20] and Cuatro Ciénegas, Mexico [21].

Despite their geological and evolutionary importance, the precise stromatolite formation mechanisms remain poorly understood. It has been proposed that net carbonate precipitation results from a balance between concurrent microbial metabolisms [22]. Photosynthesis (both oxygenic and anoxygenic) and sulfate reduction lead to local carbonate supersaturation, whereas heterotrophic metabolisms induce carbonate dissolution [23,24,25,26]. In addition, massive cyanobacterial production of exopolymeric substances (EPS), which efficiently sequester cations such as Ca<sup>2+</sup> or Mg<sup>2+</sup>,

can also inhibit carbonate precipitation [27]. Hence, microbialite formation most likely results from the interplay between microorganisms forming complex communities and their metabolic activities under the influence of environmental conditions (e.g. photoperiod, temperature) and local chemistry (ion availability).

The characterization of microbial diversity is thus crucial to further understand microbe-mineral interactions in microbialites. Most diversity studies using molecular methods have focused on marine stromatolites, where Alpha- and Gammaproteobacteria, Cyanobacteria and Planctomycetales appear to dominate [28,29,30,31,32,33,34,35]. In contrast, knowledge about lacustrine microbialites remains much sparser. Firmicutes, Gamma- and Alphaproteobacteria were the most abundant taxa in Lake Van microbialites, but these studies were carried out on 15 year-old dry samples and, hence, probably biased [13]. Recent metagenomic analysis of Cuatro Ciénegas microbialites revealed a complex community where Cyanobacteria, Alpha- and Gammaproteobacteria and Planctomycetales predominated, as in marine microbialites, identifying functions potentially linked to complex redox-dependent activities and the establishment of structured biofilms [21]. Despite these pioneering studies, the precise role in mineralization and biofilm dynamics of many bacterial taxa, but also of the much less studied eukaryotic and archaeal communities, remains to be elucidated.

Understanding the role of microorganisms in stromatolite formation and the environmental conditions promoting it requires extending microbial diversity studies to other systems, including non-hypersaline or freshwater microbialites. Indeed, lacustrine microbialites may be better analogs for several Archaean stromatolites. The fossil 3.5 Ga-old Australian stromatolites likely formed in a caldera lake [36] and the exceptionally preserved 2,7 Ga-old massive stromatolites from Tumbiana also grew under lacustrine conditions [37,38,39]. The alkaline (pH~8.9) Alchichica crater lake in the Central Mexico Plateau is particularly interesting from this perspective. Located at 2300 m above sea level and with a maximum depth of 63 m, it harbors prominent living microbialites down to at least 14 m deep [40]. Conspicuous dry microbialites emerge on the shores due to the 3–5 m lowering of the water level in the past three decades [41]. Alchichica is a monomictic lake, i.e. stratified during most of the year, the oxygenated surface water mixing with deep anoxic water only during the winter season [42]. Hydrochemistry studies show that water is Mg-rich ( $\text{Mg}/\text{Ca} = 40$ ), oversaturated with magnesium and calcium carbonates [40,43]. Accordingly, Alchichica microbialites are predominantly composed of hydromagnesite  $[\text{Mg}_5(\text{CO}_3)_4(\text{OH})_2 \cdot 4(\text{H}_2\text{O})]$  [40].

Classical morphological observations and preliminary molecular analyses focused on cyanobacteria suggested that Oscillatoriales and Pleurocapsales dominate these microbialites [40]. Here, we applied cultivation-independent molecular approaches to (i) characterize the diversity of microorganisms of the three domains of life, Bacteria, Archaea and Eucarya, in Alchichica microbialites along a 0–14 m depth gradient, (ii) compare the microbial community structure in lake microbialites with that of Alchichica microbialites maintained for two years under controlled laboratory conditions and (iii) identify microbial taxa potentially involved in carbonate precipitation and microbialite formation.

## Results

### Microbial community fingerprinting analyses of field and aquarium Alchichica microbialites

Field microbialites exhibited different colors depending on the sampling depth (Table 1). Sub-fossil microbialites at the rim of

**Table 1.** Alchichica samples analyzed in this study.

Sample	Origin	Description
AL29	0,08 m	microbialite fragment, black/dark brown
AL31*	0,5 m	microbialite fragment, black/dark brown
AL27	0,8 m	microbialite fragment, black/dark brown
AL43	1 m	microbialite fragment, dark brown
AL36	1,5 m	microbialite fragment, dark brown
AL38	2 m	microbialite fragment, dark brown
AL70	3 m	microbialite fragment, brown
AL67*	4 m	microbialite fragment, brown/dark green
AL64	5 m	microbialite fragment, dark green
AL61	6 m	microbialite fragment, green
AL58	8 m	microbialite fragment, intense emerald green
AL55	11 m	microbialite fragment, intense green/yellowish
AL52*	14 m	microbialite fragment, golden/brownish
AQ1*	Aquarium 1	microbialite fragment
AQ1b	Aquarium 1	aquarium glass wall biofilm
AQ1w	Aquarium 1	water sample
AQ2*	Aquarium 2	microbialite fragment
AQ2b	Aquarium 2	aquarium glass wall biofilm
AQ2w	Aquarium 2	water sample

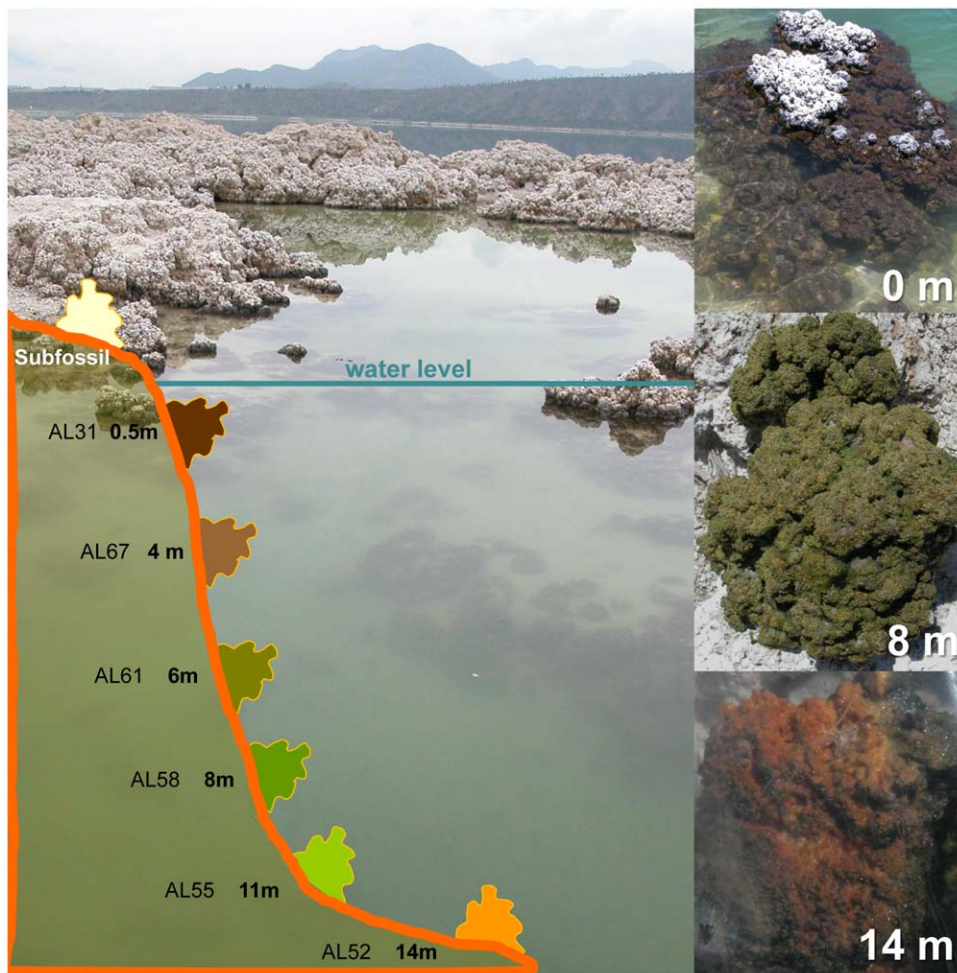
Samples used for clone library construction are noted with an asterisk. AQ1, aquarium 1; AQ2, aquarium 2.  
doi:10.1371/journal.pone.0028767.t001

the lake, out of the water, were predominantly white. Submerged, living microbialites close to the surface were dark brown to black, those at 6–8 m depth intensely emerald-green and those at the highest depth sampled (14 m) golden-brown (Figure 1). This suggests that the dominant associated communities and/or their photosynthetic and protective pigments vary according to light intensity. These differences in color were also visible in the samples set on the aquaria soon after collection (Figure S1), though they disappeared with time and, after one year, all microbialite fragments in aquaria showed a similar green color (Figure 2A).

To rapidly evaluate the complexity of the microbial communities in these microbialites and select representative samples for in-depth analyses, we obtained bacterial denaturing gel gradient electrophoresis (DGGE) fingerprints of 13 samples from different lake depths plus samples from the two aquaria (Figure S2). Cluster analysis of DGGE profiles divided the samples in two major groups. One corresponded to shallow samples (0.5–2 m), whereas the second included deeper (3–14 m) and aquarium samples. This was consistent with the fact that the aquarium fragments analyzed (Figure S1) corresponded originally to 3 m (AQ1) and 6 m (AQ2) depth and suggested that, at least partly, the native bacterial community was maintained in culture. Fingerprints from deeper samples displayed more bands, reflecting either a higher bacterial diversity or the fact that a few phylotypes dominate surface microbialites, masking minor components. The identity of some dominant and characteristic bands was investigated subsequently.

Based on DGGE profiles, we selected the three samples AL31 (0.5 m), AL67 (4 m) and AL52 (14 m), which displayed characteristic profiles and grouped in different clusters (Figure S2). More importantly, they were well distributed along the depth gradient and represented three phenotypic types in terms of color (Figure 1).





**Figure 1. View of Alchichica and schematic depth profile showing the different sampling depths in the lake.** Stromatolite fragments from three different depths and colors are shown on the right.  
doi:10.1371/journal.pone.0028767.g001

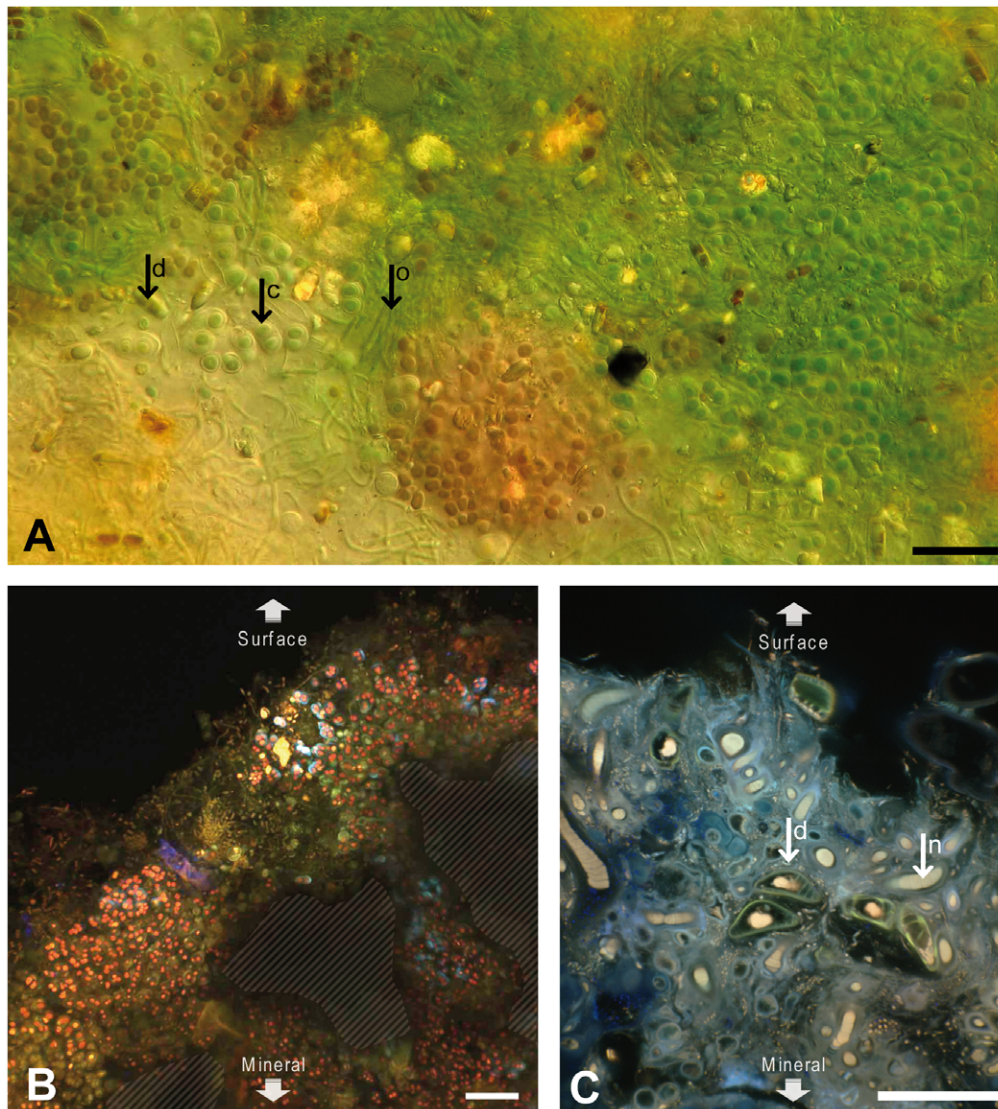
### Overview of bacterial diversity in Alchichica microbialites

Bacterial diversity in the selected samples was further characterized by SSU rRNA gene libraries (Table 2). We used general bacterial primers but also cyanobacterial-specific primers to get a finer description of the diversity within this group, since cyanobacteria usually dominate stromatolite microbial biomass, including Alchichica microbialites (Figure 2) [40], and likely play a major role in carbonate precipitation. In addition, since cyanobacterial EPS sheaths may decrease DNA extraction yield [44,45,46], using specific primers would help to detect underrepresented species. To further limit biases, we generated two bacterial and two cyanobacterial SSU rDNA libraries for each sample, except in cases when a single library allowed a coverage >80% and a small number of singletons (Table 2). There were only minor differences in the diversity obtained between the two libraries for each sample, mostly in relative proportions, in particular for a few cyanobacterial, alpha- and beta-proteobacterial phylotypes. The only significant difference was the presence of Firmicutes only in bacterial library 2. These differences are likely due to local heterogeneities and/or to a different coverage achieved by the libraries. However, despite these relatively minor differences, there was a rather good agreement in the bacterial diversity identified in the two libraries, which can therefore be considered as replicates. This was also the case for the most

abundant cyanobacterial groups in both general and specific libraries (Figure 3). Therefore, for each sample we compiled the diversity from the two independent libraries for further inter-sample comparison.

Figure 3 shows the taxonomic distribution of bacterial clones in lake and aquarium samples. We identified members of 14 phyla and 7 candidate divisions. Remarkably, bacterial diversity was generally higher in aquaria than in field samples in terms of high-rank taxa, in agreement with the DGGE analysis, which showed more bands in the aquarium profiles (Figure S2). At phylum level, AQ1 taxa resembled those of field microbialites, especially those collected at higher depth. They were all dominated by Cyanobacteria and the Alpha subdivision of the Proteobacteria (60 to 75% of the total bacterial SSU rDNAs in field sample libraries, Figure 3). AQ2 displayed similar taxonomic composition, but Cyanobacteria and Alphaproteobacteria accounted for only ~15% of sequences. In contrast, Firmicutes, minor components in the other libraries (0 to 2%), were dominant in AQ2 (29%). The rest of bacterial taxa had variable relative proportions, probably reflecting local spatial heterogeneities and/or depth-related adaptation. For example, Betaproteobacteria represented 19% of sequences in AL67 but less than 2% in other samples. The proportion of Actinobacteria increased with depth (from 1% to 10%) whereas Bacteroidetes showed the opposite trend (from 4%





**Figure 2. Images of biofilms associated to Alchichica microbialites.** (A) Photomicrograph of a fresh biofilm associated with AQ2 microbialite showing the abundance and diversity of Cyanobacteria. (B) and (C) Natural fluorescence CLSM pictures of transversal sections of AQ2 and AL66 (4 m) microbialite surfaces, respectively. AL66 (C) was stained with DAPI and calcein. Mineral areas are indicated by stripes. Biofilm biomass was dominated by photosynthetic organisms, mostly cyanobacteria of different orders, but also diatoms and green algae. Some distinguishable morphotypes are highlighted; d, diatom; c, Chroococcales; o, Oscillatoriales; n, Nostocales. Scale bars, 20 µm.  
doi:10.1371/journal.pone.0028767.g002

to 1%). Planctomycetales was one of the most constant and abundant phyla with nearly 10% of sequences in all samples, except AL67 (only 4%). AQ1 contained larger proportions of Gammaproteobacteria (8%), Deltaproteobacteria (9%) and Planctomycetales (13%) than lake samples. In general, the relative bacterial proportions in libraries appeared distributed more evenly among phyla in the deepest sample and in aquaria samples. This was in agreement with DGGE patterns, which showed more bands in AL52, reinforcing the suggestion that diversity increased with depth (especially among heterotrophic groups).

### Cyanobacteria

Confirming microscopy observations, cyanobacteria constituted the most abundant phylum in gene libraries (Figures 2 and 3). Furthermore, the distribution among cyanobacterial orders of sequences obtained with bacterial- and cyanobacterial-specific primers was remarkably similar within each sample (Figure 3). The

only exception was AQ2, with relative proportions of Chroococcales and Gloeobacterales obtained with bacterial primers much higher than those obtained with cyanobacterial primers, dominated by Oscillatoriales.

Considering all samples together, we retrieved OTUs belonging to 7 of the 8 described cyanobacterial orders (only Stigonematales were absent). The most remarkable observation was the shift of relative abundance of Oscillatoriales with depth. They largely dominated surface and intermediate microbialite sample libraries (~80% in AL31 and 90% in AL67), whereas Pleurocapsales dominated deep microbialite libraries (~80% of cyanobacterial sequences in AL52, Figure 3). In addition, Gloeobacterales were also very abundant, especially in aquarium samples (20–40% of cyanobacterial sequences, Figure 3). Chroococcales, Nostocales and Prochlorales were detected in low proportions in all samples, whereas Acaryochlorales were exclusively amplified from the deepest sample, AL52.

**Table 2.** Summary of SSU rRNA gene sequences analyzed from bacterial, cyanobacterial and eukaryotic-specific gene libraries and the associated diversity indices.

	Clone libraries	No. of clones analyzed	No. of OTUs	Ace	Chao1	Chao1 95% confidence interval	singletons	Coverage (%)
<b>Bacteria</b>	AQ1 Library 1	84	56	198	169	104/323	43	49
	AQ1 Library 2	192	93	243	215	153/339	61	68
	AQ1 total (1+2)	276	126	423	313	228/468	87	68
	AQ2 Library 1	65	42	181	147	81/328	33	49
	AQ2 Library 2	200	57	82	74	63/103	30	85
	AQ2 total (1+2)	265	86	149	134	108/190	48	82
	AL31 Library 2	199	53	119	131	82/260	31	84
	AL67 Library 2	202	31	43	42	34/73	12	94
	AL52 Library 1	44	17	39	35	21/92	11	75
	AL52 Library 2	196	67	137	113	88/171	39	80
	AL52 total (1+2)	240	74	137	122	95/180	41	83
<b>Cyanobacteria</b>	AQ1 Library 1	53	9	10	12	9/34	3	94
	AQ1 Library 2	108	7	7	7	/	0	100
	AQ1 total (1+2)	161	16	16	16	/	1	99
	AQ2 Library 1	49	13	20	21	15/56	5	90
	AQ2 Library 2	101	19	30	28	20/64	8	92
	AQ2 total (1+2)	150	22	29	36	25/89	8	95
	AL31 Library 2	63	8	11	9	8/23	3	95
	AL67 Library 2	62	6	8	6	6/14	1	98
	AL52 Library 1	39	5	5	5	/	1	97
	AL52 Library 2	61	8	10	9	7/22	3	95
	AL52 total (1+2)	100	11	21	26	14/79	6	94
<b>Eukaryotes</b>	AQ1	95	21	32	28	22/53	9	91
	AQ1 b	76	22	24	23	22/31	4	95
	AQ1 w	69	19	74	31	21/74	12	83
	AQ2	117	23	30	27	23/45	7	94
	AQ2 b	83	16	16	16	16/19	2	98
	AQ2 w	72	11	20	21	13/63	5	93
	AL31	48	1	0	1	1/1	0	100
	AL67	38	1	0	1	1/1	0	100
	AL52	38	5	7	6	6/14	2	95

AQ1b and AQ2b refer to aquarium wall-attached biofilm samples; AQ1w and AQ2w refer to plankton samples.  
doi:10.1371/journal.pone.0028767.t002

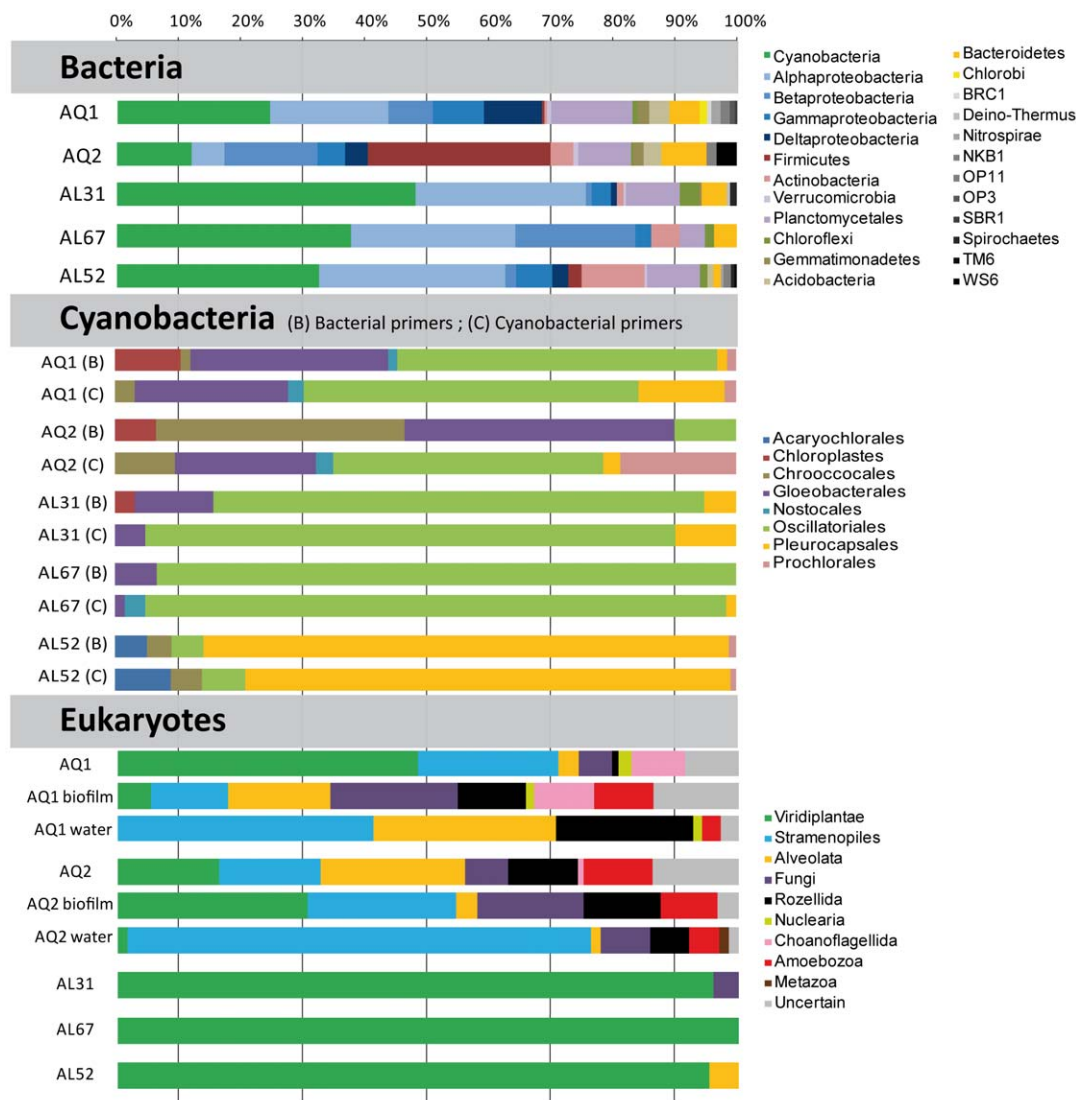
At a finer phylogenetic scale, we detected 38 cyanobacterial OTUs (including 4 diatom chloroplast sequences): 9 OTUs only in lake samples, 17 only in aquaria, and the remaining 12 were shared (Figure 4). OTU diversity was thus larger in aquaria microbialites compared to field microbialites. Oscillatoriales were the most diverse group with 16 OTUs, including 3 of the most abundant ones. These affiliated to the genus *Leptolyngbya* and were also detected in AL31 and AL67. Pleurocapsales were the second most diverse group with 5 OTUs. One of them (CyanoOTU35) accounted for 69% of all cyanobacterial sequences in the 14 m-deep sample AL52 (Figure 4). This phylotype was also present in the other lake samples and in AQ1, though in lower proportions. Its high abundance in deep samples was corroborated by DGGE analyses, corresponding to one of the most intense bands in deep sample fingerprints (band J in samples AL58, AL55 and AL52, Figure S2 and Table 3).

In addition to Pleurocapsales, the Acaryochlorales OTU CyanoOTU23 was relatively abundant at 14 m, in agreement

with the low-light-intensity adaptation characteristic of Acaryochlorales [47]. We also detected 5 Chroococcales OTUs, one of them (CyanoOTU32) particularly abundant at 8 m (AL58 sample) as shown by DGGE analyses (band I in Figure S2 and Table 3). Finally, we identified 3 very divergent OTUs belonging to the deep-branching Gloeobacterales. Among them, CyanoOTU02, identified in field sample AL31 (0.5 m), represented 18% and 20% of AQ1 and AQ2 cyanobacterial sequences.

#### Other bacterial taxa with photosynthetic members

Apart from cyanobacteria, we identified phylotypes of other bacterial phyla that comprise phototrophic, in addition to heterotrophic, members: Alphaproteobacteria, Gammaproteobacteria and Chloroflexi. With ~30% of field sample clones, Alphaproteobacteria was the second most abundant group after Cyanobacteria (Figure 3). Their relative abundance was constant with depth. They were also extremely diverse, with 68 OTUs: 35



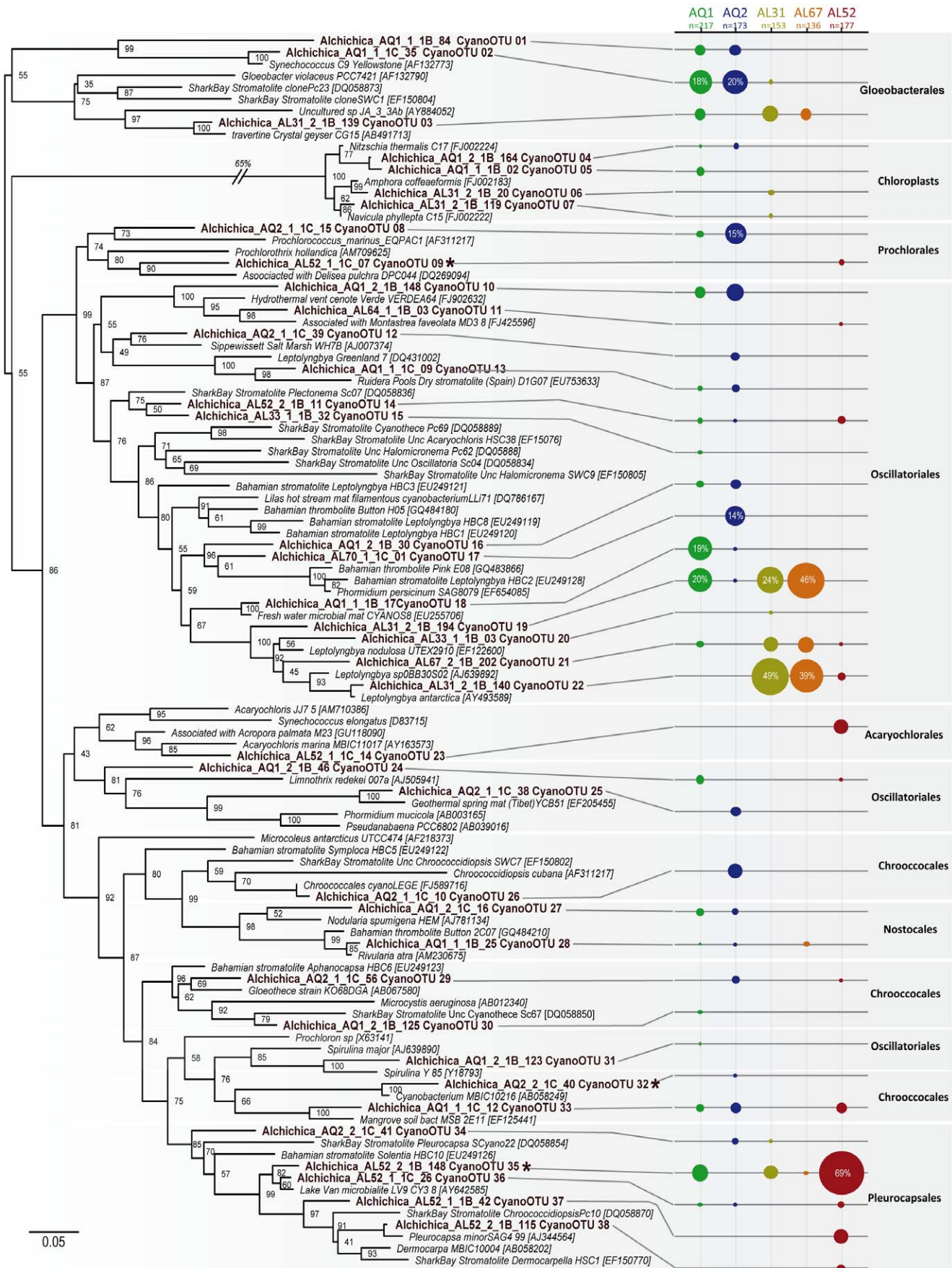
**Figure 3. Phylogenetic distribution of bacterial, cyanobacterial and eukaryotic SSU rRNA gene sequences in Alchichica microbialites.** In the specific panel for cyanobacteria, the phylogenetic distribution of cyanobacterial clones retrieved with universal bacterial primers (B) or with specific cyanobacterial primers (C) is shown for comparison. Sample names and origins are explained in Table 1. Non-Latin names correspond to Candidate Divisions; Deino-Thermus, *Deinococcus/Thermus* group.  
doi:10.1371/journal.pone.0028767.g003

exclusively identified in field samples, 23 in the aquaria and 10 in both field samples and aquaria (Figure S3). The composition of the deeper samples AL67 and AL52 was similar, with high proportions of Rhodospirillales and Rhodobacterales, whereas Rhizobiales were scarce in them but more abundant in the shallowest sample AL31. The most abundant Rhodobacterales OTU, AlphaOTU65 (34% and 24% of AL67 and AL52 sequences, respectively), was relatively close to members of the metabolically versatile genus *Rhodobacter*. Many *Rhodobacter* species are sulfur-oxidizing photosynthesizers and, in the context of the lake, AlphaOTU65 might actually correspond to anoxygenic photosynthesizers. Moreover, many Rhodospirillales (e.g. *Rhodospirillum*), represented by the abundant phylotypes AlphaOTU20 and AlphaOTU21, and Rhizobiales (e.g. *Rhodomicrobium*), are also anoxygenic photosynthesizers [48]. In contrast, the vast majority of Gammaproteobacteria phylotypes likely have heterotrophic metabolisms. However, some might be photosynthetic; for example the Chromatiales GammaOTU06 (Figure S4), related

to environmental sequences from the Mexican alkaline lake Texcoco [49], suggesting an adaptation to these particular alkaline environmental conditions.

Chloroflexi (green non-sulfur bacteria) are typically anoxygenic photosynthesizers, although an increasing number of non-photosynthetic lineages (Anaerolineae, Caldilineae and Dehalococcoides) has also been characterized [50]. Likely phototrophic Alchichica representatives were ChloroOTU1 and ChloroOTU2, related to *Chloroflexus* and *Chlorothrix*, though probable heterotrophic OTUs related to *Anaerolinea* and other environmental Chloroflexi were more diverse (Figure S5). In contrast to their low proportion in gene libraries (Figure 3), DGGE analyses suggested a high abundance of Chloroflexi in Alchichica microbialites. Such difference may reflect a negative bias in the general primers used for gene library construction, as already noted in the study of Ruidera stromatolites [19,50]. In fact, seven of the most intense DGGE bands from Alchichica field samples (bands A, B, C, D, G, K and M; Figure S2 and Table 3) were





**Figure 4. Maximum likelihood (ML) phylogenetic tree of SSU rDNA of cyanobacteria and chloroplasts from Alchichica microbialites.** Numbers at nodes indicate bootstrap values. Sequences from this study are in bold. Relative proportions of the different OTUs in each sample are indicated by circles of proportional size on the right. The number (n) indicates the number total of clones analyzed for each sample. Asterisks indicate OTUs also identified in DGGE patterns. The scale bar indicates the number of substitutions per site for a unit branch length.  
doi:10.1371/journal.pone.0028767.g004

assigned to Chloroflexi after sequencing, including four (C, D, G and M) related to the two likely anoxygenic photosynthesizers ChloroFOTU1 and ChloroFOTU2. Bands C, G and M, 100% identical to the corresponding ChloroFOTU2 sequence, were detected in nearly all field samples, suggesting that this OTU was abundant at all depths. In contrast, typical photosynthetic Chloroflexi were not detected in aquaria (Figure 3).

### Typical heterotrophic bacterial taxa

Along with the potential photosynthetic OTUs mentioned above, many microbialite bacteria belonging to Alphaproteobacteria, Gammaproteobacteria (Figures S3 and S4), Chloroflexi, Chlorobi and Acidobacteria are most likely heterotrophic (Figures S5 and S6). In addition, we found 19 OTUs of Deltaproteobacteria (Figure S4), including several Myxococcales and others corresponding most likely to sulfate-reducing bacteria (SRB). Betaproteobacteria, with 15 OTUs, were detected in all microbialite samples and particularly abundant in AL67 and AQ2 (Figures 3 and S7). The most abundant betaproteobacterial OTU in field samples (BetaOTU03) corresponded to *Delfia acidovorans*, a strict aerobe able to degrade diverse complex compounds [51].

Planctomycetales were moderately abundant (5–15% of sequences) but highly diverse, with 62 OTUs (Figure S8). Planctomycetales are able to oxidize a large range of substrates, including many different polysaccharides, which explains their frequent association to microbialites, where they probably degrade cyanobacterial EPS [13,52]. As Planctomycetales, Bacteroidetes were also diverse (27 OTUs, Figure S9). They are known to oxidize complex organics like cell wall polymers [53].

We also identified Gram positive bacteria. Firmicutes were relatively diverse (18 OTUs) but quasi-exclusively in AQ2, including several sequences related to strict fermentative anaer-

obes (e.g. Clostridiales) and phylotypes from anoxic environments. Actinobacteria were also diverse (17 OTUs), many from AL52 (Figure S10). Some were Rubrobacterales (ActinoOTU3 specifically related to *Rubrobacter radiotolerans*), known for their high resistance to UV and ionizing radiation [54]. This could reflect the fact that Alchichica is at high altitude and, therefore, exposed to strong UV radiation.

Although most Chlorobi (green sulfur bacteria) are photosynthetic [48], the only Alchichica OTU from this group was related to the chemoheterotroph *Ignavibacterium album* (Figure S5). Likewise, a phototrophic lifestyle could not be predicted for the Acidobacteria sequences (Figure S6), very distantly related to the photoheterotroph *Chloracidobacterium* [55]. Finally, we identified bacteria belonging to eleven additional phyla or candidate divisions: Verrucomicrobia, Spirochaeta, with several OTUs related to sequences detected in alkaline or hypersaline microbialites and microbial mats, the nitrite-oxidizing Nitrospira, Thermus/Deinococcus, and the candidate divisions OP11, WS6, SBR1, BRC1, NKB19, TM6 and OP3 (Figures S8 and S11).

### Archaeal diversity

Despite of the use of different archaeal-specific primers and PCR conditions, we failed to amplify archaeal sequences from field samples selected for detailed study (AL31, AL67, AL52). From the rest of samples, we only retrieved two archaeal phylotypes from AL70 (3 m) and the aquarium sample AQ1 (Figure S12 and Table 1). ArchaeOTU01 was a singleton related to euryarchaeotal hot spring or hypersaline mat environmental clones. ArchaeaOTU02, detected in both AL70 and AQ1, was close to the Thaumarchaeota *Cenarchaeum* and *Nitrosopumilus* and, thus, probably an ammonium-oxidizer [56]. These results suggest that archaea are present in the microbialites but in minor proportions and very low diversity.

**Table 3. Closest Alchichica microbialite OTUs to sequences of DNA fragments amplified from DGGE bands.**

Band	First hit	Identity	Taxonomy	Corresponding OTU
A	Contig_AL67_2_1B_154	84%	Bacteria; Chloroflexi	ChloroFOTU11 (Fig. S5)
B	Contig_AL67_2_1B_105	98%	Bacteria; Chloroflexi	ChloroFOTU10 (Fig. S5)
C	Contig_AL31_2_B_35	100%	Bacteria; Chloroflexi	ChloroFOTU02 (Fig. S5)
D	Contig_AL67_2_1B_187	86%	Bacteria; Chloroflexi	ChloroFOTU01 (Fig. S5)
E	Contig_AL67_2_1B_14	91%	Bacteria; Bacteroidetes	BactOTU10 (Fig. S9)
F	Contig_AQ2_2_1B_199	97%	Bacteria; Bacteroidetes	BactOTU07 (Fig. S9)
G	Contig_AL31_2_1B_35	100%	Bacteria; Chloroflexi	ChloroFOTU02 (Fig. S5)
H	Contig_AL67_2_1B_14	98%	Bacteria; Bacteroidetes	BactOTU10 (Fig. S9)
I	Contig_AQ2_2_1C_40	97%	Bacteria; Cyanobacteria; Chroococcales	CyanoOTU32 (Fig. 4)
J	Contig_AL52_1_1C_37	97%	Bacteria; Cyanobacteria; Pleurocapsales	CyanoOTU35 (Fig. 4)
K	Contig_AQ1_1_1B_10	99%	Bacteria; Chloroflexi	ChloroFOTU07 (Fig. S5)
L	Contig_AL52_1_1C_07	91%	Bacteria; Cyanobacteria; Prochlorales	CyanoOTU09 (Fig. 4)
M	Contig_AL31_2_1B_35	100%	Bacteria; Chloroflexi	ChloroFOTU02 (Fig. S5)
N	Contig_AQ2_2_1B_212	98%	Bacteria; Actinobacteria; Rubrobacteridae	ActinoOTU03 (Fig.S10)

Bands correspond to those labeled in Figure S2.  
doi:10.1371/journal.pone.0028767.t003

## Protist diversity

Although protists are conspicuous microbialite inhabitants [57], their diversity in these environments has been rarely studied. To prevent library saturation with animal sequences, we amplified SSU rRNA genes using the primer UNonMet, biased towards non-metazoan eukaryotes [58]. In addition to libraries from the selected samples AL31, AL67, AL52 and aquarium microbialites, we amplified protist SSU rDNAs from the aquarium plankton (AQ1w and AQ2w) and non-calcified biofilms growing on aquarium walls (AQ1b and AQ2b). These samples should serve as controls to identify specific protist phylotypes associated with growing microbialites. The number of clones analyzed for each sample is summarized in Table 2.

There were important differences between field and aquarium samples and also between plankton and microbialites in the aquaria, whereas the aquarium non-calcified biofilms were similar to the aquarium microbialites (Figure 3). Field microbialites were dominated by one single chlorophyte (ChlorophytOTU05, related to the sessile genera *Pseudendoclonium* and *Blidingia*), representing ~90% of all sequences in AL31 and AL67, and ~70% in AL52 (Figure 5). Two additional chlorophytes were identified in AL52: ChlorophytOTU06, also related to those two genera, and ChlorophytOTU01, very close to *Rhizoclonium hieroglyphicum*, an entangling filamentous algae widespread in microbial mats in fresh or brackish waters [59]. AL52 also contained a dinoflagellate OTU related to the photosynthetic genus *Woloszynskia*. No other photosynthetic eukaryotes were found in the lake, although they certainly exist since living diatoms were observed by microscopy (Figure 2) and their chloroplast SSU rRNA genes were detected in sample AL31 (see above). Field samples were thus dominated by green algae, which possibly masked other eukaryotes present in minor proportions. Thus, only two additional non-photosynthetic phylotypes were identified in AL31, both corresponding to fungi (Figure S13).

Aquaria samples were far more diverse. Among photosynthetic protists, ChlorophytOTU05, dominant in field microbialites, was also abundant in aquarium microbialites, especially AQ1. However, it was absent from both the aquarium plankton and the non-calcified biofilms (Figure 5). It thus seems specifically associated to microbialites, opening the possibility that it plays a role in their formation or stability. A few other chlorophytes and several other photosynthetic lineages were identified in aquaria, notably diatoms (StramenoOTU05-07) and chrysophytes (StramenoOTU03, frequent in plankton). Concerning heterotrophic eukaryotes, ciliates (Figure 5) and very diverse opisthokonts were found in the aquaria (Figure S13). The latter included most notably Fungi, with typical Ascomycota, Basidiomycota and Chytridiomycota, but also OTUs of the environmental LKM11 group, now classified as Rozellida or Cryptomycota [60]. A relatively large diversity of Amoebozoa and choanoflagellates was also found, the latter almost exclusively in AQ1 and never in the planktonic fraction. We also identified nucleariids and several divergent sequences at the base of the Choanoflagellida/Icthyosporea and at the base of the Metazoa without close relatives (Figure S13).

## Discussion

To address the long-term question of understanding microbial-mineral interactions and how microbialites form, we first aimed at characterizing microbial communities inhabiting Alchichica microbialites at different depths. The recurrent presence of particular abundant lineages may point out to specific metabolisms and lead to hypotheses about their role in carbonate precipitation and

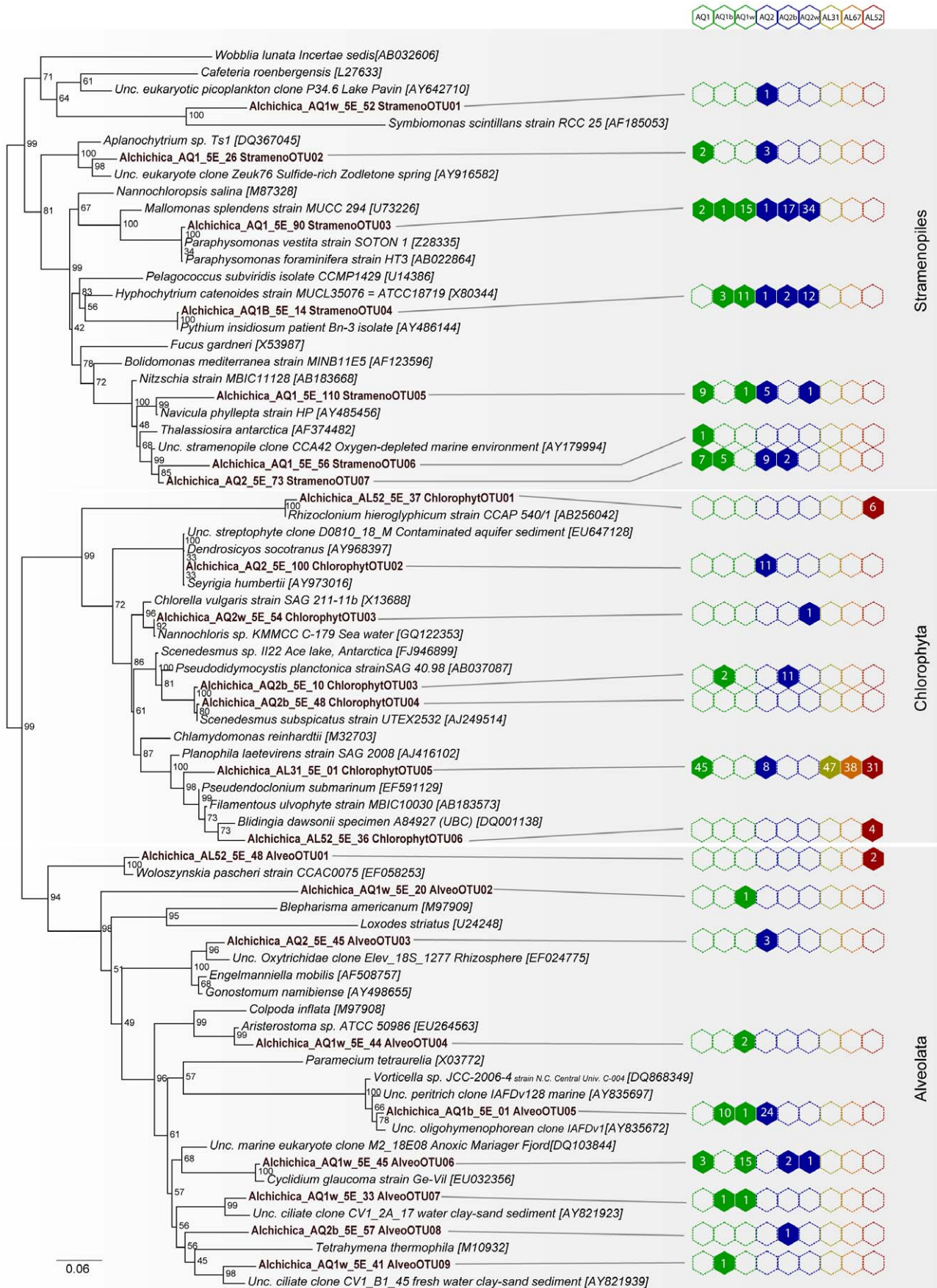
microbialite formation. Another important issue is the possibility to preserve a significant fraction of the original microbial communities in laboratory aquaria. This would allow mineralization experiments under controlled conditions using complex and fairly genuine diverse microbial communities. Thus, we studied the diversity of microorganisms belonging to the three domains of life in an integrative approach rarely undertaken for this kind of systems.

## Alchichica field microbialite community structure and its variation with depth

Field microbialites at all depths were largely dominated by Cyanobacteria and Alphaproteobacteria. As in Shark Bay stromatolites, where ~10% of the Alphaproteobacteria were potential anoxygenic photosynthesizers [29], many Alchichica Alphaproteobacteria are likely photosynthetic. Most likely, Alchichica alphaproteobacterial phylotypes display diverse metabolisms going from autotrophy to heterotrophy which, together with their richness, suggests an important role in microbialite biofilm organization and activity. Chloroflexi, present in all samples and probably abundant according to DGGE fingerprinting, was the third Alchichica bacterial group with photosynthetic members. In addition to photosynthesizers, typical heterotrophs such as Planctomycetales, Bacteroidetes and Actinobacteria, were recurrently present at relative high frequency, whereas Beta-, Gamma- and Deltaproteobacteria and Firmicutes showed more variable proportions (Figure 3). The dominant Cyanobacteria and Alphaproteobacteria, accompanied by relatively abundant Planctomycetales, Firmicutes and Bacteroidetes have been reported in comparable systems including Cuatro Ciénegas [21], Bahamas [34,35] and Shark Bay [29,33]. In addition, many of the closest relatives to Alchichica sequences come from alkaline systems, notably the giant microbialites of Lake Van, more similar by its physico-chemical characteristics to Alchichica microbialites than marine or hypersaline lake ones [13]. This observation was statistically confirmed by comparing the bacterial community composition of Alchichica samples with those of Shark Bay, Bahamas and Lake Van. All Alchichica samples clustered together, forming two clusters, one for lake samples, with 0.5 and 4 m depth samples more closely related, and the other for aquarium microbialites (Figure 6). From the other samples, although much more distant, Lake Van was closer to Alchichica samples than the marine stromatolites.

Two important observations can be outlined from Alchichica microbialite bacterial diversity. First, even if many photosynthetic lineages are present, the relative abundance of typical heterotrophic lineages suggests that they play an important role. Second, the most remarkable change along the depth gradient was the marked shift in the cyanobacterial community composition, dominated by filamentous Oscillatoriales in surface and intermediate depths (>90% of sequences at 0.5 and 4 m) and by Pleurocapsales in deeper samples (>80% of sequences, contributed mostly by the phylotype CyanoOTU35). This shift was detected by gene library comparison but also by sequencing intense DGGE bands (Figure S2 and Table 3). Although variation of the cyanobacterial composition at larger spatial scales (>few centimeters), as evidenced in Hamelin Pool [29,33] and Bahamas [32], cannot be discarded, the Oscillatoriales-to-Pleurocapsales dominance transition with depth in Alchichica is likely related to adaptation to depth and light intensity. Oscillatoriales are indeed adapted to high light intensity [61], whereas Pleurocapsales actively search low light (Waterbury and Stanier, 1978). This correlates with microscopy observations showing that filamentous Oscillatoriales tend to grow at the microbialite surface (e.g.





**Figure 5. ML phylogenetic tree of bikont eukaryotic SSU rDNA sequences from Alchichica microbialites.** Numbers at nodes indicate bootstrap values. Sequences from this study are in bold. Numbers of clones retrieved from each sample for each OTU are given on the right. The scale bar indicates the number of substitutions per site for a unit branch length. doi:10.1371/journal.pone.0028767.g005

Figure 2A), where their massive presence can obscure that of other microbialite-associated bacteria, whereas the coccoid or pseudo-filamentous *Pleurocapsales* are intimately associated to the mineral matrix (unpublished observations). The differential presence of these morphologically dissimilar cyanobacteria may have a significant impact on the organization of the microbialite biofilms.

In contrast with the recognized importance of bacteria in microbialite formation and dynamics, archaea and microbial eukaryotes might have been overlooked in the past. Our results show that archaea are present in Alchichica microbialites but in minor proportions and very low diversity. This confirms observations from Shark Bay (7% of sequences, [29], Bahamas (1–2%, [31] and Cuatro Ciénegas [21] stromatolites. Consequently, the role of archaea in microbialite formation is probably minor. Inversely, some reports based on microscopy observations suggest that microbial eukaryotes could be relevant in microbialites [57,62], though their diversity has rarely been assessed. The only available molecular studies, done in Shark Bay and Bahamas stromatolites [34], detected a very low diversity of eukaryotes compared to bacteria. However, protist diversity might have been underestimated with general eukaryotic primers, which lead to rapid saturation of gene libraries by metazoan sequences, especially nematodes [34]. Thus, very little is known about protist contribution to biofilm biodiversity, biomass, structure and lithification. Here, we avoided gene library saturation by metazoans using primers biased against animal sequences. Despite so, we found a low eukaryotic diversity in field microbialites, corresponding essentially to chlorophytes, with some fungi in the deepest sample. Therefore, the major eukaryotic players in Alchichica appear to be green algae, with a same phylotype (*Chlorophyt*OTU05) dominating along the depth gradient.

Finally, although a variety of physico-chemical parameters were measured in the water column during sampling as well as subsequent microbialite mineralogical and isotopic analyses [40], establishing correlations of these with microbialite microbial community composition is difficult because of the inherent

heterogeneity of these systems. Microbialites are irregular, exhibiting different orientations to light at a same depth, and are spatially structured, offering a variety of niches with different physico-chemical parameters at microscale. Establishing meaningful correlations between local environmental parameters and microbial diversity will require further studies at microscale.

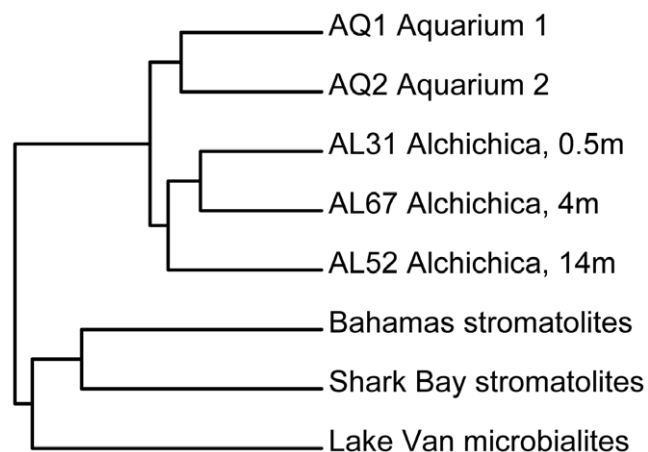
### Field versus aquaria microbialites

The observation of a large microbial diversity in microbialites maintained for two years in the laboratory was unexpected for two reasons. First, only relatively small microbialite fragments were installed in aquaria, which might not carry individuals of all the microbial species living in the lake microbialites. Second, since the laboratory conditions were much more stable (e.g., a remarkably constant pH, Figure S1), we expected that a few, perhaps opportunistic, lineages became dominant and excluded the rest of the native microbial diversity. However, not only the diversity of most of the abundant lineages found in the lake was maintained, but bacteria and eukaryotes were much more diverse in laboratory microbialites (Table 2). Indeed, bacterial communities in aquaria were, despite their differences, more similar between them than to the lake samples (Figure 6).

The increase of microbial diversity in aquaria concerns very diverse groups thriving at pH 8.9. This minimizes the possibility of potential contaminants coming from the laboratory, which would be outcompeted by the well-adapted Alchichica alkaliphiles. The stable conditions in aquaria appear not only to have maintained organisms dominant in the different field samples, but also favored the growth of microbes that were in low proportions in the lake. To our knowledge, there is only another example that compares the diversity of cultured versus natural microbialites [28]. Although in this case cultured microbialites were artificial (fused oolitic sand grains inoculated with Bahamian stromatolite microorganisms), a good preservation of the community composition after 1.5 years was inferred by comparison of Shannon indices. These observations suggest a remarkable resilience of microbialite communities.

Gloeobacterales offer an example of increased diversity and abundance in aquaria microbialites (Figure 3). These cyanobacteria have raised much attention because of their basal position in phylogenetic trees, being the only group branching before chloroplasts, and because unusual features such as the lack of thylakoids and particular photosystems [63,64,65,66,67]. For many years, the only cultured species was *Gloeobacter violaceus*, isolated from calcareous rock [65,68]. More recently, “*Synechococcus* sp. C9” was isolated from a mat in Yellowstone alkaline Octopus spring [63,69]. Several environmental sequences were recently added to the group, mostly coming from microbial mats or microbialites, such as the Shark Bay stromatolites [30,33], suggesting that the whole group may be adapted to this kind of environments. Our very distant Alchichica sequences encompass the whole known diversity within this order (Figure 4).

The larger diversity in aquarium microbialites was particularly manifest in the case of microbial eukaryotes. Whereas a few green algal phylotypes dominated lake microbialites, cultured microbialites contained those lineages but also a wide variety of other photosynthetic species, including diatoms and chrysophytes, diverse other stramenopiles and ciliates (Figure 5) and many opisthokonts (Figure S13). Possibly, most of these protists were



**Figure 6. Hierarchical clustering analysis (UPGMA) of bacterial communities associated to microbialites of various settings based on pairwise UniFrac metrics.** Pairwise comparisons were all significantly different ( $p$  value  $< 0.001$ ). doi:10.1371/journal.pone.0028767.g006



present in the lake but thrive to large, detectable amounts under stable laboratory conditions. The diversity of opisthokonts was remarkable. Several fungal lineages were detected in microbialites, notably members of the Rozellida [70] or Cryptomycota [60], which constitute the deepest lineage of fungi and groups parasitic flagellates very common in freshwater systems [71]. The diversity of choanoflagellates, amoebae, nucleariids, and several divergent sequences at the base of the Choanoflagellates/Icthyosporea and at the base of the Metazoa (Figure S13), makes these microbialites interesting to explore lineages placed at the onset of metazoan evolution.

### Microbial metabolism-based model of microbialite formation

Taking into account the most likely metabolisms of the microorganisms detected in field and aquarium microbialites, we propose to extend the model of formation of microbialites originally built on marine Bahamian stromatolites [22] to Alchichica (Figure S14). Microbialite formation would be the net result of a balance between metabolic activities favoring carbonate precipitation or dissolution, which would in turn depend on light availability (day or night) and on local physico-chemical conditions (e.g. oxic or anoxic microenvironments) [22].

As in the Bahamas case, the most important metabolism involved is probably bacterial photosynthesis, in particular the oxygenic photosynthesis carried out by the very abundant cyanobacteria. Photosynthesis drives the alkalinity engine towards carbonate precipitation by consuming bicarbonate [22] and increasing local pH [72,73]. Although much less studied, eukaryotic photosynthesizers may play a similar role since many eukaryotic algae induce comparable changes in pH and CO<sub>2</sub> concentration [74]. In addition, eukaryotic algae can provide nucleation sites [62] and trap particles [75]. Similarly, anoxygenic photosynthetic bacteria, such as the phototrophic *Chloroflexi* likely abundant in Alchichica, also increase local alkalinity and induce carbonate precipitation [76]. In addition, part of the H<sub>2</sub>S consumed by anoxygenic photosynthesis may come from the activity of SRB, represented in Alchichica by *Deltaproteobacteria* and *Firmicutes*. Sulfate reduction generates carbonate ions, thus being another activity potentially leading to carbonate precipitation [23,24,25,77]. This process, independent of light availability, can take place during day and night.

Alchichica microbialites also contain diverse and abundant heterotrophic bacteria, including *Planctomycetales*, *Bacteroidetes*, *Acidobacteria*, many *Proteobacteria* and various others. They can induce carbonate dissolution due to respiration of organic matter and production of protons [27] but they can also promote carbonate precipitation by liberating cations sequestered by EPS and other macromolecules, making them available for precipitation. Indeed, many of these heterotrophs are known to degrade complex polymeric compounds, including EPS [78]. The balance between these processes determines the net formation of carbonate.

Even if the major role in carbonate precipitation and dissolution is probably due to activities of the largely dominant bacterial community, the role of eukaryotes should not be neglected. Photosynthetic algae may have a direct role on carbonate precipitation and an indirect role associated to chemical properties of the cell walls that provide nucleation centers for crystal growth [79,80]. In addition to their photosynthetic activity, diatoms embedded in the carbonates could be relevant for secondary silicification since, after death, their frustules supply Si. Finally, Alchichica fungi, some of which may be endolithic, also deserve further study. They could make the system more fragile by

forming pervasive microborings but also serve as new calcification centers [81]. At any rate, protists play an important role as grazers and predators, exerting a control over bacteria and being involved in the fine-tuning of the community structure and its activities.

## Materials and Methods

### Sampling and maintenance of living microbialites in aquaria

Samples were collected from Lake Alchichica (N 19°25.119; W 97°23.860, Puebla State, Mexico) in July 2007. No specific permits were required for the described field studies, the location is not privately-owned or protected and the field studies did not involve endangered or protected species. Several physico-chemical parameters were measured in the water column at different depths including total dissolved solutes, pH, temperature, concentrations of Cl<sup>-</sup>, SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>, Br<sup>-</sup>, F<sup>-</sup>, Na<sup>+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, K<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Li<sup>+</sup>, O<sub>2</sub>, Si, NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>, NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, N/P ratios, conductivity, alkalinity, suspended matter and the saturation index for several minerals [40]. Similarly, bulk mineralogical and isotopic ( $\delta^{13}\text{C}$  and  $\delta^{18}\text{O}$ ) analyses of microbialites at different depths were carried out [40]. Living microbialite fragments were collected by scuba diving along a depth gradient from immediately below surface down to 14 m in depth. Samples for microbiology studies were picked up with gloves and sterile forceps to minimize all possible contamination, introduced in Falcon tubes and fixed *in situ* in ethanol (80% final concentration). They were kept at room temperature during transport, then stored at 4°C until processing. Several larger microbialite fragments (>10 cm) were placed in sterile plastic containers filled with lake water for transfer to laboratory aquaria. A layer of small (1 cm) fragments of sub-fossil, rim Alchichica microbialites was deposited at the bottom of aquaria in order to buffer the solution pH and chemical composition. Living microbialite fragments were deposited in aquarium 1 (AQ1, fragments collected at 30 cm, 3 m and 8 m depth) and aquarium 2 (AQ2, fragments collected at 80 cm, 1 m and 6 m depth). Aquaria were illuminated with 15w – 10 lumens/W fluorescent tubes producing solar spectral wavelength. Photoperiods were adjusted to 12 h of daylight for AQ1 and 16 h of light for AQ2. Temperature and pH were measured once a month and water loss due to evaporation replaced by distilled water. Despite some temperature variation over time for over 3 years after collection, pH remained remarkably constant at 8.9 (Supplementary Figure S1). The aquarium microbialite samples collected for molecular analyses were taken from the fragments from 3 m (AQ1) and 6 m (AQ2) depth.

### Optical and confocal laser scanning microscopy

Fresh aquarium microbialite-associated biofilms were examined using a Zeiss Axioplan 2 optical microscope and photographed with a Canon PowerShot G5 camera. We also prepared microbialite inclusions in resin for the observation of transversal sections using confocal laser scanning microscopy (CLSM). Several samples were stained with 4',6'-diamidino-2-phenylindole or DAPI (1 µg/ml; 10 minutes at room temperature) and/or calcein (0.1 mg/ml; 36 h at 4°C) prior to inclusion. Microbialite fragments were dehydrated in a gradual series of ethanol baths (30%, 50%, 70%, 90%, and 100%), and progressively impregnated with hard grade LR-white resin (Polysciences, Inc.). Samples were incubated for 18 h at 4°C in (1/1) then (2/1) mixture of LR-white/ethanol and finally in pure LR-white resin. After 3 h at room temperature, samples were embedded in pure LR-white resin for 1 h at 40°C and then for 24 h at 60°C. After polymerization, transverse cross-sections were cut with a diamond

wire and polished (diamond powder  $\frac{1}{4}$   $\mu\text{m}$ ). These sections were examined using a FluoView™ FV1000 confocal laser scanning microscope with a spectral resolution of 2 nm (Olympus). The FluoView™ FV1000 was equipped with a 405 nm laser diode, and multi-line argon (458 nm, 488 nm, and 515 nm), helium-neon-green (543 nm) and helium-neon-red (633 nm) lasers. Fluorescence images of the microbialite transversal sections were obtained with concomitant excitation at wavelengths of 405 nm, 488 nm, and 543 nm and collection of the emitted fluorescence between 425–475 nm, 500–530 nm, and 560–660 nm, respectively.

### DNA purification

Total genomic DNA was extracted 1) from ethanol-fixed field samples selected along a depth profile in the lake and 2) from aquaria microbialites 2 years after collection. A small fragment ( $\sim 1$   $\text{cm}^3$ ) from each microbialite sample was ground using a sterile agate mortar. 200  $\mu\text{l}$  of the resulting powder were transferred to an eppendorf tube. Carbonates were largely dissolved by adding 100  $\mu\text{l}$  of HCl at 33% for 30 s then neutralized with 1 ml of a 1:1 mixture of PBS pH 7 and 0.5 M EDTA pH 9. Samples were centrifuged for 5 min at 12500 rpm. DNA was extracted from the pellet using two different methods. In a preliminary assay, DNA was purified with the QuickPick™ gDNA Kit (Bio-Nobile, Parainen, Finland) following the instructions of the manufacturer except that samples were previously incubated for 3 h at 56°C with 0.5  $\mu\text{l}$  of Proteinase K extra (20 mg/ml) and 1.5  $\mu\text{l}$  of Viscozyme®. In a second assay DNA was purified using the MoBioPowerSoil DNA kit (MoBio, Carlsbad, CA, USA) after a first incubation step with 2  $\mu\text{l}$  of Viscozyme® (Sigma-Aldrich, Buchs, Switzerland) (1 h at 37°C) in order to enhance degradation of the abundant exopolymeric substances. According to preliminary tests (data not shown), the second protocol produced a better extraction yield and was thus applied on every sample selected along the depth gradient. However, we include in the present study the results of libraries constructed using DNA purified with the first method as replicates. Libraries constructed using DNA purified by the first method were labeled Library 1; those made with the second one are labeled Library 2.

### Denaturing gel gradient electrophoresis (DGGE) analysis

SSU rDNA fragments of approximately 150 bp were amplified from DNA purified from different microbialite samples using the MoBio kit with the specific bacterial forward primer 341F-GCclamp (CGCCCCGCCGCGCGCGGGCGGGCGGGCGGGGCGGGGCGGCACGGGGGGG CCTACGGGAGGCAGCAG) and the reverse bacterial primer 543R (ATTACCGCGGCTGCTGG) [82]. Polymerase chain reactions (PCR) were performed under the following conditions: an initial denaturation step at 94°C for 3 min, 30 cycles consisting of a denaturation step at 94°C for 15 s, an annealing step of 30 s (a touch down procedure with a decreasing annealing temperature from 65°C to 55°C for the 10 first cycles was applied followed by a hybridization temperature of 55°C for the following 20 cycles) and a polymerization step at 72°C for 1.5 min, and a final step of 1 h extension at 72°C (modified from [82]). Migration of PCR products was done in a denaturing gradient gel using the CBS Scientific (California, USA) electrophoresis system. Urea and formamide were used as denaturing agents with a concentration gradient from 30% to 60%. 50 bp-ladder markers (Promega, Lyon, France) were intercalated every three samples. The gels were stained with SYBR Gold (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) and photographed under UV light. Gels were normalized according to the ladder migration using the software Bionumerics® (AppliedMaths, Sint-Martens-Latem, Belgium). A distance matrix based on the

presence/absence of bands in the different samples was used for cluster analysis of samples using the Jaccard coefficient [83].

### Small subunit rRNA gene library construction

We constructed SSU rDNA libraries specific for archaea, bacteria, cyanobacteria and microbial eukaryotes from five selected samples: three field samples from three different depths AL31 (0.5 m), AL67 (3 m), AL52 (14 m) and two samples from the two aquaria. Samples from aquarium microbialites used in this study were collected after 17 months (Libraries 1) and 27 months (Libraries 2). To amplify SSU rDNA, the following sets of specific primers were used: B-27F (AGAGTTTGATCCTGGCTCAG) and 1492R (GGTTACCTTGTTACGACTT) for bacteria; CYA106F (CGGACGGGTGAGTAACGCGTGA) [44] and 23S30R (CTTCGCCTCTGTGTGCCTAGGT) for cyanobacteria; Ar109 (AC(G/T)GCTGCTCAGTAACACGT) and 1492R for archaea and 82F (GAAACTGCGAATGGCTC) and UN-onMet (TTTAAGTTTCAGCCTTGCG) for non-metazoan eukaryotes [58]. PCR reactions were performed under the following conditions: 30 cycles (denaturation at 94°C for 15 s, annealing at 50–55°C for 30 s, extension at 72°C for 2 min) preceded by 2 min denaturation at 94°C, and followed by 7 min extension at 72°C. Clone libraries were constructed using the TopoTA cloning kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. Clone inserts were partially sequenced ( $\sim 800$  bp) by Beckman Coulter Genomics (Takeley, United Kingdom) using first the reverse primer 1492R for bacteria (including cyanobacteria) and archaea and the forward primer 82F for eukaryotes. At least one representative clone per phylotype or Operational Taxonomic Unit (OTU, group of sequences sharing >97% identity) was fully sequenced for detailed phylogenetic analysis. Sequences were deposited in GenBank with accession numbers JN825302–JN825705.

### Phylogenetic analyses

A total of 1143 bacterial clones excluding cyanobacteria amplified with specific cyanobacterial primers, 526 cyanobacterial clones (in addition to cyanobacterial clones retrieved with general bacterial primers) and 598 eukaryotic clones were analyzed. The closest relatives to these sequences were identified by BLAST [84,85] and retrieved from GenBank (<http://ncbi.nlm.nih.gov/>). Several datasets (one for each life domain and one specific for cyanobacteria) were constructed and aligned using MAFFT [86]. A preliminary phylogenetic analysis of all partial sequences was done by distance methods (neighbor-joining, NJ), allowing the identification of identical or nearly identical sequences and the selection of representative clones for subsequent analysis. The multiple alignment was then manually edited using the program ED from the MUST package [87]. Final phylogenetic trees included our sequences together with their closest relatives in GenBank and some representative cultivated species. Maximum likelihood (ML) phylogenetic trees were reconstructed using TREEFINDER [88] applying a general time reversible (GTR) model of sequence evolution, and taking among-site rate variation into account by using a four-category discrete approximation of a  $\Gamma$  distribution. Maximum likelihood bootstrap proportions were inferred using 1,000 replicates. Phylogenetic trees were viewed using FIGTREE [89].

### Estimates of microbial diversity and community comparison analyses

Distance matrices were generated for each clone library using ClustalX software [90]. They were used as input for the software

DOTUR [91], which was used to cluster sequences in OTUs using an identity cut-off of 0.03. Richness estimations (Chao1 and Ace) were calculated using DOTUR with default settings. Coverage values were calculated using the Good estimator [92] following the equation  $C = (1 - n/N) \times 100$ , where  $C$  is the percentage of coverage of the library,  $n$  the number of singletons and  $N$  the total number of clones examined. To compare the composition of bacterial communities associated to Alchichica microbialites with those associated to Bahamas [31] and Shark Bay [29] stromatolites as well as to the alkaline Lake Van microbialites [13], we recovered the SSU rDNA bacterial sequences from those studies and constructed an alignment containing 3040 sequences using MAFFT [86]. We then constructed an approximately maximum likelihood phylogenetic tree based on 338 unambiguously aligned positions using FastTree [93]. We then compared  $\beta$ -diversity measurements and obtained pairwise  $p$ -values using UniFrac [94] as implemented in the software MOTHUR [95].

## Supporting Information

**Figure S1** Alchichica microbialites maintained in laboratory aquaria. A. Initial setting of microbialites fragments in aquaria with different photoperiods. B. Microbialites after one year of cultivation in aquaria. C. Measurements of pH and temperature over time. Orange symbols (aquarium 1); blue symbols, aquarium 2. Red bars indicate points at which aquaria were sampled for the clone Library 1 and Library 2 construction of the present study. (TIF)

**Figure S2** Cluster analysis of DGGE fingerprints of bacteria associated to Alchichica microbialites. The name and depth of each sample are given on the right. AQ1 and AQ2 correspond to samples from laboratory aquaria. The scale bar above the dendrogram shows distances (%) between samples based on presence/absence of bands. Grey bars at nodes indicate the standard deviation. Bands labeled with capital letters were cut for sequencing. Samples labeled with an asterisk were chosen for detailed molecular diversity analyses. (TIF)

**Figure S3** Maximum likelihood (ML) phylogenetic tree of alphaproteobacterial SSU rDNAs from Alchichica microbialites. Numbers at nodes indicate bootstrap values. Sequences from this study are in bold. Relative proportions of the different OTUs in each sample are indicated by circles of proportional size on the right. The number ( $n$ ) indicates the number total of clone analyzed for each sample. The scale bar indicates the number of substitutions per site for a unit branch length. (TIF)

**Figure S4** Maximum likelihood (ML) phylogenetic tree of SSU rDNA sequences of Deltaproteobacteria and Gammaproteobacteria from Alchichica microbialites. Numbers at nodes indicate bootstrap values. Sequences from this study are in bold. Numbers of clones retrieved from each sample for each OTU are given on the right. The scale bar indicates the number of substitutions per site for a unit branch length. (TIF)

**Figure S5** Maximum likelihood phylogenetic tree of SSU rDNA sequences of Chloroflexi and Chlorobi from Alchichica microbialites. Numbers at nodes indicate bootstrap values. Sequences from this study are in bold. Numbers of clones retrieved from each sample for each OTU are given on the right. Asterisks indicate OTUs also identified in DGGE patterns. The scale bar indicates the number of substitutions per site for a unit branch length. (TIF)

**Figure S6** Maximum likelihood (ML) phylogenetic tree of SSU rDNA sequences of Gemmatimonadetes and Acidobacteria from Alchichica microbialites. Numbers at nodes indicate bootstrap values. Sequences from this study are in bold. Numbers of clones retrieved from each sample for each OTU are given on the right. The scale bar indicates the number of substitutions per site for a unit branch length.

(TIF)

**Figure S7** Maximum likelihood (ML) phylogenetic tree of SSU rDNA sequences of Betaproteobacteria from Alchichica microbialites. Numbers at nodes indicate bootstrap values. Sequences from this study are in bold. Numbers of clones retrieved from each sample for each OTU are given on the right. The scale bar indicates the number of substitutions per site for a unit branch length.

(TIF)

**Figure S8** Maximum likelihood (ML) phylogenetic tree of SSU rDNA sequences of Planctomycetales and Verrucomicrobia from Alchichica microbialites. Numbers at nodes indicate bootstrap values. Sequences from this study are in bold. Numbers of clones retrieved from each sample for each OTU are given on the right. The scale bar indicates the number of substitutions per site for a unit branch length.

(TIF)

**Figure S9** Maximum likelihood (ML) phylogenetic tree of SSU rDNA sequences of Bacteroidetes from Alchichica microbialites. Numbers at nodes indicate bootstrap values. Sequences from this study are in bold. Numbers of clones retrieved from each sample for each OTU are given on the right. Asterisks indicate OTUs also identified in DGGE patterns. The scale bar indicates the number of substitutions per site for a unit branch length.

(TIF)

**Figure S10** Maximum likelihood (ML) phylogenetic tree of SSU rDNA sequences of Actinobacteria and Firmicutes from Alchichica microbialites. Numbers at nodes indicate bootstrap values. Sequences from this study are in bold. Numbers of clones retrieved from each sample for each OTU are given on the right. Asterisks indicate OTUs also identified in DGGE patterns. The scale bar indicates the number of substitutions per site for a unit branch length.

(TIF)

**Figure S11** Maximum likelihood (ML) phylogenetic tree of SSU rDNA sequences of CD OP11, CD WS6, Deinococcus-Thermus, CD SBR1, CD BRC1, CD NKB19, Nitrospira, CD TM6, CD OP3 and Spirochaeta from Alchichica microbialites. Numbers at nodes indicate bootstrap values. Sequences from this study are in bold. Numbers of clones retrieved from each sample for each OTU are given on the right. The scale bar indicates the number of substitutions per site for a unit branch length.

(TIF)

**Figure S12** Maximum likelihood (ML) phylogenetic tree of SSU rDNA sequences of Archaea from Alchichica microbialites. Numbers at nodes indicate bootstrap values. Sequences from this study are in bold. Numbers of clones retrieved from each sample for each OTU are given in brackets. The scale bar indicates the number of substitutions per site for a unit branch length.

(TIF)

**Figure S13** Maximum likelihood (ML) phylogenetic tree of SSU rDNA sequences of Unikonts (Amoebozoa plus Opisthokonta) from Alchichica microbialites. Numbers at nodes indicate bootstrap values. Numbers of clones retrieved from each sample

for each OTU are given on the right. The scale bar indicates the number of substitutions per site for a unit branch length. (TIF)

**Figure S14** Hypothetical model of carbonate formation dynamics based on known metabolisms of microbial lineages detected in Alchichica microbialites. The panels represent the activities that would occur during day (left) and; night (right) in areas where oxygenic (upper panels) or anoxygenic (lower panels) photosynthesis predominates. (TIF)

## References

1. Burne RV, Moore LS (1987) Microbialites: organosedimentary deposits of benthic microbial communities. *Palaos* 2: 241–254.
2. Riding R (2000) Microbial carbonates: the geological record of calcified bacterial-algal mats and biofilms. *Sedimentology* 47: 179–214.
3. Grotzinger JP, Knoll AH (1999) Stromatolites in Precambrian carbonates: Evolutionary mileposts or environmental dipsticks? *Annual Review of Earth and Planetary Sciences* 27: 313–358.
4. Altermann W (2004) Precambrian Stromatolites: Problems in definition, classification, morphology and stratigraphy. In: Elsevier, editor Eriksson PG, Altermann W, Nelson DR, Mueller W, Catuneanu O, eds. *The Precambrian Earth: Tempos and Events Developments in Precambrian Geology*. pp 564–574.
5. Allwood AC, Walter MR, Kamber BS, Marshall CP, Burch IW (2006) Stromatolite reef from the Early Archaean era of Australia. *Nature* 441: 714–718.
6. Awramik SM (1971) Precambrian columnar stromatolite diversity: reflection of metazoan appearance. *Science* 174: 825–827.
7. Altermann (2006) Cyanobacterial calcification and its rock-building potential during 3.5 billion years of Earth history. *Geobiology*.
8. Reid RP, James NP, Macintyre IG, Dupraz CP, Burne RV (2003) Shark Bay stromatolites: Microfabrics and reinterpretation of origins. *Facies* 49: 299–324.
9. Burns BP, Goh F, Allen M, Neilan BA (2004) Microbial diversity of extant stromatolites in the hypersaline marine environment of Shark Bay, Australia. *Environmental Microbiology* 6: 1096–1101.
10. Riding R, Awramik SM, Winsborough BM, Griffin KM, Dill RF (1991) Bahamian Giant Stromatolites - Microbial Composition of Surface Mats. *Geological Magazine* 128: 227–234.
11. Andres MS, Reid RP (2006) Growth morphologies of modern marine stromatolites: A case study from Highborne Cay, Bahamas. *Sedimentary Geology* 185: 319–328.
12. Kempe S, Kazmierczak J (1990) Chemistry and Stromatolites of the Sea-Linked Satonda Crater Lake, Indonesia - a Recent Model for the Precambrian Sea. *Chemical Geology* 81: 299–310.
13. Lopez-Garcia P, Kazmierczak J, Benzerara K, Kempe S, Guyot F, et al. (2005) Bacterial diversity and carbonate precipitation in the giant microbialites from the highly alkaline Lake Van, Turkey. *Extremophiles* 9: 263–274.
14. Arp G, Thiel V, Reimer A, Michaelis W, Reimer J (1999) Biofilm exopolymers control microbialite formation at thermal springs discharging into the alkaline Pyramid Lake, Nevada, USA. *Sedimentary Geology* 126: 159–176.
15. Kempe S, Kaźmierczak Jz (1993) Satonda Crater Lake, Indonesia: Hydrogeochemistry and biocarbonates. *Facies* 28: 1–31.
16. Arp G, Reimer A, Reimer J (2004) Microbialite formation in seawater of increased alkalinity, Satonda Crater Lake, Indonesia - Reply. *Journal of Sedimentary Research* 74: 318–325.
17. Benzerara K, Meibom A, Gautier Q, Kazmierczak J, Stolarski J, et al. (2010) Nanotextures of aragonite in stromatolites from the quasi-marine Satonda crater lake, Indonesia. *Geological Society, London, Special Publications* 336: 211–224.
18. Kazmierczak J, Kempe S (2006) Genuine modern analogues of Precambrian stromatolites from caldera lakes of Niuafo'ou Island, Tonga. *Naturwissenschaften* 93: 119–126.
19. Santos F, Pena A, Nogales B, Soria-Soria E, del Cura MAG, et al. (2010) Bacterial diversity in dry modern freshwater stromatolites from Ruidera Pools Natural Park, Spain. *Systematic and Applied Microbiology* 33: 209–221.
20. Spadafora A, Perri E, McKenzie JA, Vasconcelos C (2010) Microbial biomineralization processes forming modern Ca/Mg carbonate stromatolites. *Sedimentology* 57: 27–40.
21. Breitbart M, Hoare A, Nitti A, Siefert J, Haynes M, et al. (2009) Metagenomic and stable isotopic analyses of modern freshwater microbialites in Cuatro CiEnegas, Mexico. *Environmental Microbiology* 11: 16–34.
22. Dupraz C, Reid RP, Braissant O, Decho AW, Norman RS, et al. (2009) Processes of carbonate precipitation in modern microbial mats. *Earth-Science Reviews* 96: 141–162.
23. Visscher PT, Reid RP, Bebout BM, Høft SE, Macintyre IG, et al. (1998) Formation of lithified micritic laminae in modern marine stromatolites (Bahamas): The role of sulfur cycling. *American Mineralogist* 83: 1482–1493.
24. Visscher PT, Reid RP, Bebout BM (2000) Microscale observations of sulfate reduction: Correlation of microbial activity with lithified micritic laminae in modern marine stromatolites. *Geology* 28: 919–922.
25. Baumgartner LK, Reid RP, Dupraz C, Decho AW, Buckley DH, et al. (2006) Sulfate reducing bacteria in microbial mats: Changing paradigms, new discoveries. *Sedimentary Geology* 185: 131–145.
26. Braissant O, Decho AW, Dupraz C, Glunk C, Przekop KM, et al. (2007) Exopolymeric substances of sulfate-reducing bacteria: Interactions with calcium at alkaline pH and implication for formation of carbonate minerals. *Geobiology* 5: 401–411.
27. Dupraz C, Visscher PT (2005) Microbial lithification in marine stromatolites and hypersaline mats. *Trends in Microbiology* 13: 429–438.
28. Havemann SA, Foster JS (2008) Comparative Characterization of the Microbial Diversities of an Artificial Microbialite Model and a Natural Stromatolite. *Applied and Environmental Microbiology* 74: 7410–7421.
29. Papineau D, Walker JJ, Mojzsis SJ, Pace NR (2005) Composition and structure of microbial communities from stromatolites of Hamelin Pool in Shark Bay, Western Australia. *Applied and Environmental Microbiology* 71: 4822–4832.
30. Allen MA, Goh F, Burns BP, Neilan BA (2009) Bacterial, archaeal and eukaryotic diversity of smooth and pustular microbial mat communities in the hypersaline lagoon of Shark Bay. *Geobiology* 7: 82–96.
31. Moberley LK, Spear JR, Buckley DH, Pace NR, Reid RP, et al. (2009) Microbial diversity in modern marine stromatolites, Highborne Cay, Bahamas. *Environmental Microbiology* 11: 2710–2719.
32. Foster JS, Green SJ, Ahrendt SR, Golubic S, Reid RP, et al. (2009) Molecular and morphological characterization of cyanobacterial diversity in the stromatolites of Highborne Cay, Bahamas. *Isme Journal* 3: 573–587.
33. Goh F, Allen MA, Leuko S, Kawaguchi T, Decho AW, et al. (2009) Determining the specific microbial populations and their spatial distribution within the stromatolite ecosystem of Shark Bay. *Isme Journal* 3: 383–396.
34. Myszrall KL, Moberley JM, Green SJ, Visscher PT, Havemann SA, et al. (2010) Biogeochemical cycling and microbial diversity in the thrombolitic microbialites of Highborne Cay, Bahamas. *Geobiology* 8: 337–354.
35. Moberley JM, Ortega MC, Foster JS (2011) Comparative microbial diversity analyses of modern marine thrombolitic mats by barcoded pyrosequencing. *Environmental Microbiology*, no-no.
36. Van Kranendonk MJ, Philippot P, Lepot K, Bodorkos S, Pirajno F (2008) Geological setting of Earth's oldest fossils in the ca. 3.5 Ga Dresser Formation, Pilbara Craton, Western Australia. *Precambrian Research* 167: 93–124.
37. Buick R (2008) When did oxygenic photosynthesis evolve? *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 363: 2731–2743.
38. Lepot K, Benzerara K, Brown GE, Philippot P (2008) Microbially influenced formation of 2,724-million-year-old stromatolites. *Nature Geoscience* 1: 118–121.
39. Awramik SM, Buchheim HP (2009) A giant, Late Archean lake system: The Meentheena Member (Tumbiana Formation; Fortescue Group), Western Australia. *Precambrian Research* 174: 215–240.
40. Kaźmierczak J, Kempe S, Kremer B, López-García P, Moreira D, et al. (2011) Hydrochemistry and microbialites of the alkaline crater lake Alchichica, Mexico. *Facies*. pp 1–28.
41. Caballero M, Vilaclara G, Rodríguez A, Juárez D (2003) Short-term climatic change in lake sediments from lake Alchichica, Oriental, Mexico. *Geofísica Internacional* 42: 529–537.
42. Macek M, Pestova D, Perez MEM (2008) Seasonal and spatial dynamics of a ciliate assemblage in a warm-monomictic Lake Alchichica (Puebla, Mexico). *Hidrobiologica* 18: 25–35.
43. Armienta MA, Vilaclara G, De la Cruz-Reyna S, Ramos S, Cenicerros N, et al. (2008) Water chemistry of lakes related to active and inactive Mexican volcanoes. *Journal of Volcanology and Geothermal Research* 178: 249–258.
44. Nubel U, Garcia-Pichel F, Muyzer G (1997) PCR primers to amplify 16S rRNA genes from cyanobacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 63: 3327–3332.
45. Pinto FL, Thapper A, Sontheim W, Lindblad P (2009) Analysis of current and alternative phenol based RNA extraction methodologies for cyanobacteria. *Bmc Molecular Biology* 10.

## Acknowledgments

We thank warmly B. Kramer (Foundation for Polish Science) for her role in co-organizing the 2007 Alchichica Lake expedition. We also thank S. Kempe and H.V. Henschel for their participation to our sampling expedition.

## Author Contributions

Conceived and designed the experiments: PL-G DM KB. Performed the experiments: EC EG. Analyzed the data: EC PL-G DM. Contributed reagents/materials/analysis tools: PL-G KB. Wrote the paper: EC PL-G DM KB. Field work: PL-G DM JK RT.

46. Morin N, Vallaeys T, Hendrickx L, Natalie L, Wilmette A (2010) An efficient DNA isolation protocol for filamentous cyanobacteria of the genus *Arthrospira*. *Journal of Microbiological Methods* 80: 148–154.
47. Chen M, Quinnell RG, Larkum AWD (2002) Chlorophyll d as the major photopigment in *Acaryochloris marina*. *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines* 6: 763–773.
48. Madigan M, Martinko J, Dunlap P, Clark D (2009) *Brock Biology of Microorganisms*, 12th ed. San Francisco: Pearson International Edition.
49. Valenzuela-Encinas C, Neria-Gonzalez I, Alcantara-Hernandez RJ, Estrada-Alvarado I, de la Serna FJZD, et al. (2009) Changes in the bacterial populations of the highly alkaline saline soil of the former lake Texcoco (Mexico) following flooding. *Extremophiles* 13: 609–621.
50. Sekiguchi Y, Yamada T, Hanada S, Ohashi A, Harada H, et al. (2003) *Anaerolinea thermophila* gen. nov., sp. nov. and *Caldilinea aerophila* gen. nov., sp. nov., novel filamentous thermophiles that represent a previously uncultured lineage of the domain Bacteria at the subphylum level. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 53: 1843–1851.
51. Wen AM, Fegan M, Hayward C, Chakraborty S, Sly LI (1999) Phylogenetic relationships among members of the Comamonadaceae, and description of *Delftia acidovorans* (den Dooren de Jong 1926 and Tamaoka et al. 1987) gen. nov., comb. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* 49: 567–576.
52. Krieg NR, Staley JT, Brown DR, Hedlund BP, Paster BJ, et al. (2010) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*.
53. Bernardet JF, Grimont PAD (1989) Deoxyribonucleic-Acid Relatedness and Phenotypic Characterization of *Flexibacter-Columnaris* Sp-Nov, Nom Rev, *Flexibacter-Psychrophilus* Sp-Nov, Nom Rev, and *Flexibacter-Maritimus* Wakabayashi, Hikida, and Masumura 1986. *International Journal of Systematic Bacteriology* 39: 346–354.
54. Ferreira AC, Nobre MF, Moore E, Rainey FA, Battista JR, et al. (1999) Characterization and radiation resistance of new isolates of *Rubrobacter radiotolerans* and *Rubrobacter xylanophilus*. *Extremophiles* 3: 235–238.
55. Bryant DA, Costas AMG, Maresca JA, Chew AGM, Klatt CG, et al. (2007) *Candidatus Chloracidobacterium thermophilum*: An aerobic phototrophic acidobacterium. *Science* 317: 523–526.
56. Pester M, Schleper C, Wagner M (2011) The Thaumarchaeota: an emerging view of their phylogeny and ecophysiology. *Curr Opin Microbiol* 14: 300–306.
57. Al-Qassab S, Lee WJ, Murray S, Simpson AGB, Patterson DJ (2002) Flagellates from stromatolites and surrounding sediments in Shark Bay, Western Australia. *Acta Protozoologica* 41: 91–144.
58. Bower SM, Carnegie RB, Goh B, Jones SRM, Lowe GJ, et al. (2004) Preferential PCR amplification of parasitic protistan small subunit rDNA from metazoan tissues. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 51: 325–332.
59. Guiry MD, Guiry GM (2011) *AlgaeBase*. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. <http://www.algaebase.org>.
60. Jones MDM, Forn I, Gadelha C, Egan MJ, Bass D, et al. (2011) Discovery of novel intermediate forms redefines the fungal tree of life. *Nature advance online publication*.
61. van der Grinten E, Janssen APHM, de Mutsert K, Barranguet C, Admiraal W (2005) Temperature- and light-dependent performance of the cyanobacterium *Leptolyngbya foveolarum* and the diatom *Nitzschia perminuta* in mixed biofilms. *Hydrobiologia* 548: 267–278.
62. Winsborough BM, Golubic S (1987) The Role of Diatoms in Stromatolite Growth - 2 Examples from Modern Fresh-Water Settings. *Journal of Phycology* 23: 195–201.
63. Turner S, Pryer KM, Miao VPW, Palmer JD (1999) Investigating deep phylogenetic relationships among cyanobacteria and plastids by small subunit rRNA sequence analysis. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 46: 327–338.
64. Gupta RS, Mathews DW (2010) Signature proteins for the major clades of Cyanobacteria. *BMC EVOLUTIONARY BIOLOGY* 10.
65. Nakamura Y, Kaneko T, Sato S, Mimuro M, Miyashita H, et al. (2003) Complete genome structure of *Gloeobacter violaceus* PCC 7421, a cyanobacterium that lacks thylakoids. *DNA Research* 10: 137–145.
66. Tsuchiya T, Takaichi S, Misawa N, Maoka T, Miyashita H, et al. (2005) The cyanobacterium *Gloeobacter violaceus* PCC 7421 uses bacterial-type phytoene desaturase in carotenoid biosynthesis. *FEBS Letters* 579: 2125–2129.
67. Mimuro M, Yokono M, Akimoto S (2010) Variations in Photosystem I Properties in the Primordial Cyanobacterium *Gloeobacter violaceus* PCC 7421. *Photochemistry and Photobiology* 86: 62–69.
68. Rippka R, Waterbury J, Cohen-Bazire G (1974) A cyanobacterium which lacks thylakoids. *Archives of Microbiology* 100: 419–436.
69. Ferris MJ, RuffRoberts AL, Kocczynski ED, Bateson MM, Ward DM (1996) Enrichment culture and microscopy conceal diverse thermophilic *Synechococcus* populations in a single hot spring microbial mat habitat. *Applied and Environmental Microbiology* 62: 1045–1050.
70. Lara E, Moreira D, Lopez-Garcia P (2010) The Environmental Clade LKM11 and Rozella Form the Deepest Branching Clade of Fungi. *Protist* 161: 116–121.
71. Lepere C, Boucher D, Jardillier L, Domaizon I, Debroas D (2006) Succession and regulation factors of small eukaryote community composition in a lacustrine ecosystem (Lake pavin). *Applied and Environmental Microbiology* 72: 2971–2981.
72. Arp G, Reimer A, Reitner J (2001) Photosynthesis-induced biofilm calcification and calcium concentrations in Phanerozoic oceans. *Science* 292: 1701–1704.
73. Paerl HW, Steppe TF, Reid RP (2001) Bacterially mediated precipitation in marine stromatolites. *Environmental Microbiology* 3: 123–130.
74. Choo KS, Snoeijis P, Pedersen M (2002) Uptake of inorganic carbon by *Cladophora glomerata* (Chlorophyta) from the Baltic Sea. *Journal of Phycology* 38: 493–502.
75. Awramik SM, Riding R (1988) Role of Algal Eukaryotes in Subtidal Columnar Stromatolite Formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 85: 1327–1329.
76. Bosak T, Greene SE, Newman DK (2007) A likely role for anoxygenic photosynthetic microbes in the formation of ancient stromatolites. *Geobiology* 5: 119–126.
77. Bauld JP, Chambers LAp, Skyring GWp Primary Productivity, Sulfate Reduction and Sulfur Isotope Fractionation in Algal Mats and Sediments of Hamelin pool, Shark Bay, W. A. \par. 753–764\par.
78. Bauer M, Kube M, Teeling H, Richter M, Lombardot T, et al. (2006) Whole genome analysis of the marine Bacteroidetes 'Gramella forsetii' reveals adaptations to degradation of polymeric organic matter. *Environmental Microbiology* 8: 2201–2213.
79. Frey P, Verrecchia EP (1998) Freshwater organisms that build stromatolites: a synopsis of biocrystallization by prokaryotic and eukaryotic algae. *Sedimentology* 45: 535–563.
80. Souza-Egipsy V, Del Cura AG, Ascaso C, De Los Rios A (2006) Interaction between calcite and phosphorus in biomineralization processes in tufa carbonates. *International Review of Hydrobiology* 91: 222–241.
81. Golubic S, Radtke G, Le Campion-Alsumard T (2005) Endolithic fungi in marine ecosystems. *Trends in Microbiology* 13: 229–235.
82. Muyzer G, Dewaal EC, Uitterlinden AG (1993) Profiling of Complex Microbial Populations by Denaturing Gradient Gel-Electrophoresis Analysis of Polymerase Chain Reaction-Amplified Genes-Coding for 16s Ribosomal-Rna. *Applied and Environmental Microbiology* 59: 695–700.
83. Jaccard P (1901) Distribution de la Flore Alpine dans le Bassin des Dranses et dans quelques régions voisines. *Bulletin de la Société vaudoise des sciences naturelles* 37: 241–272.
84. Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang JH, Zhang Z, et al. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research* 25: 3389–3402.
85. Zhang Z, Schwartz S, Wagner L, Miller W (2000) A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *Journal of Computational Biology* 7: 203–214.
86. Katoh K, Misawa K, Kuma K, Miyata T (2002) MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. *Nucleic Acids Research* 30: 3059–3066.
87. Philippe H (1993) MUST, a computer package of management utilities for sequences and trees. *Nucleic Acids Research* 21: 5264–5272.
88. Jobb G, von Haeseler A, Strimmer K (2004) TREEFINDER: a powerful graphical analysis environment for molecular phylogenetics. *BMC EVOLUTIONARY BIOLOGY* 4: 18.
89. Rambaut A (2009) FIGTREE <http://tree.bio.ed.ac.uk/>.
90. Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, et al. (2007) Clustal W and clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23: 2947–2948.
91. Schloss PD, Handelsman J (2005) Introducing DOTUR, a computer program for defining operational taxonomic units and estimating species richness. *Applied and Environmental Microbiology* 71: 1501–1506.
92. Good IJ (1953) The population frequencies of species and the estimation of population parameters. *Biometrika* 40: 237–264.
93. Price MN, Dehal PS, Arkin AP (2010) FastTree 2-Approximately Maximum-Likelihood Trees for Large Alignments. *Plos One* 5.
94. Lozupone C, Knight R (2005) UniFrac: a new phylogenetic method for comparing microbial communities. *Applied and Environmental Microbiology* 71: 8228–8235.
95. Schloss PD, Westcott SL, Ryabin T, Hall JR, Hartmann M, et al. (2009) Introducing mothur: Open-Source, Platform-Independent, Community-Supported Software for Describing and Comparing Microbial Communities. *Applied and Environmental Microbiology* 75: 7537–7541.

**A**

## Aquarium 1

initial pH = 9.45  
Photoperiod: 12 h  
(8 a.m. – 8 p.m.)



## Aquarium 2

initial pH = 9.35  
Photoperiod: 16 h  
(6 a.m. – 10 p.m.)

**t = 0** (July 07, 2007)



**AL30**  
50 cm

**AL69**  
3 m

**AL57**  
8 m

**AL60**  
80 cm

**AL42**  
1 m

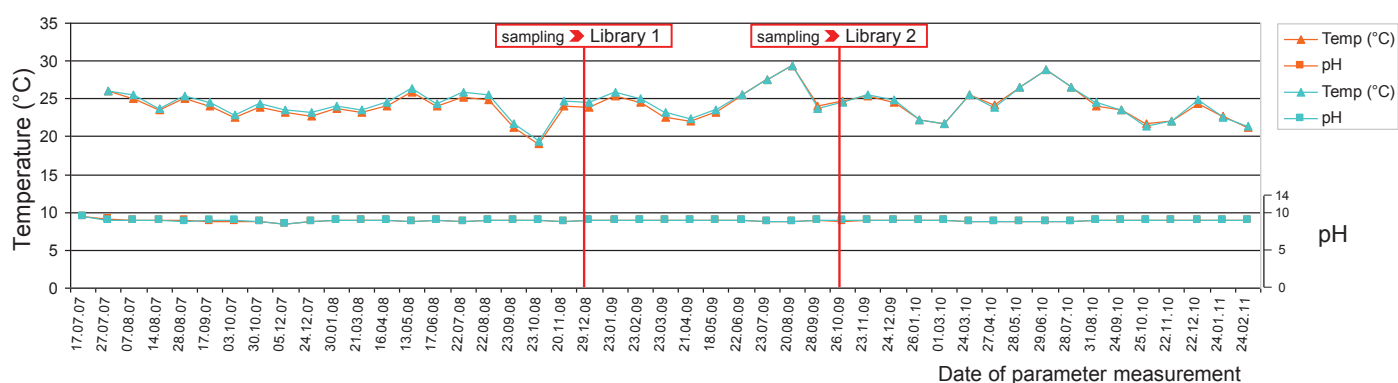
**AL60**  
6 m

**B**



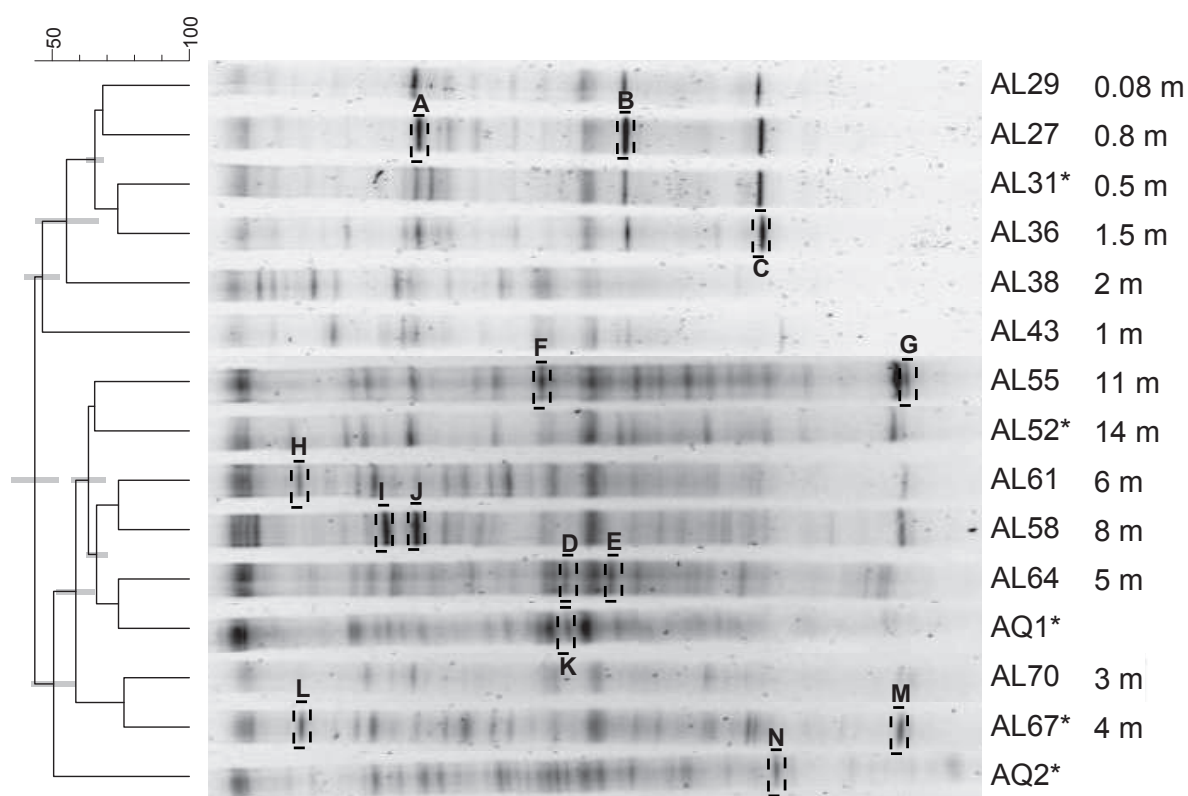
**t = 1 year**

**C**

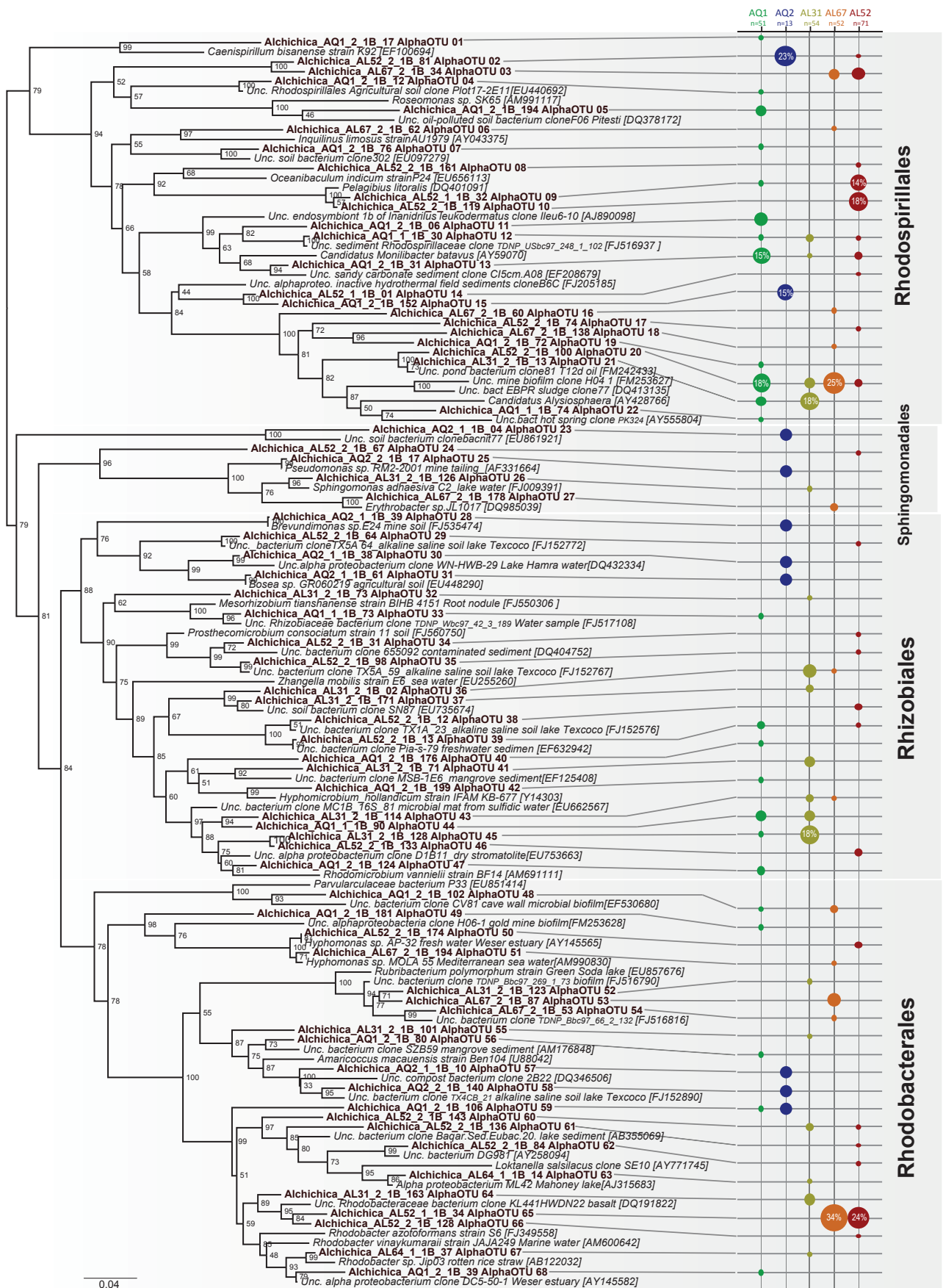


**Figure S1.** Alchichica microbialites maintained in laboratory aquaria. A. Initial setting of microbialites fragments in aquaria with different photoperiods. B. Microbialites after one year of cultivation in aquaria. C. Measurements of pH and temperature over time. Orange symbols (aquarium 1); blue symbols, aquarium 2. Red bars indicate points at which aquaria were sampled for the clone Library 1 and Lybrary 2 construction of the present study.

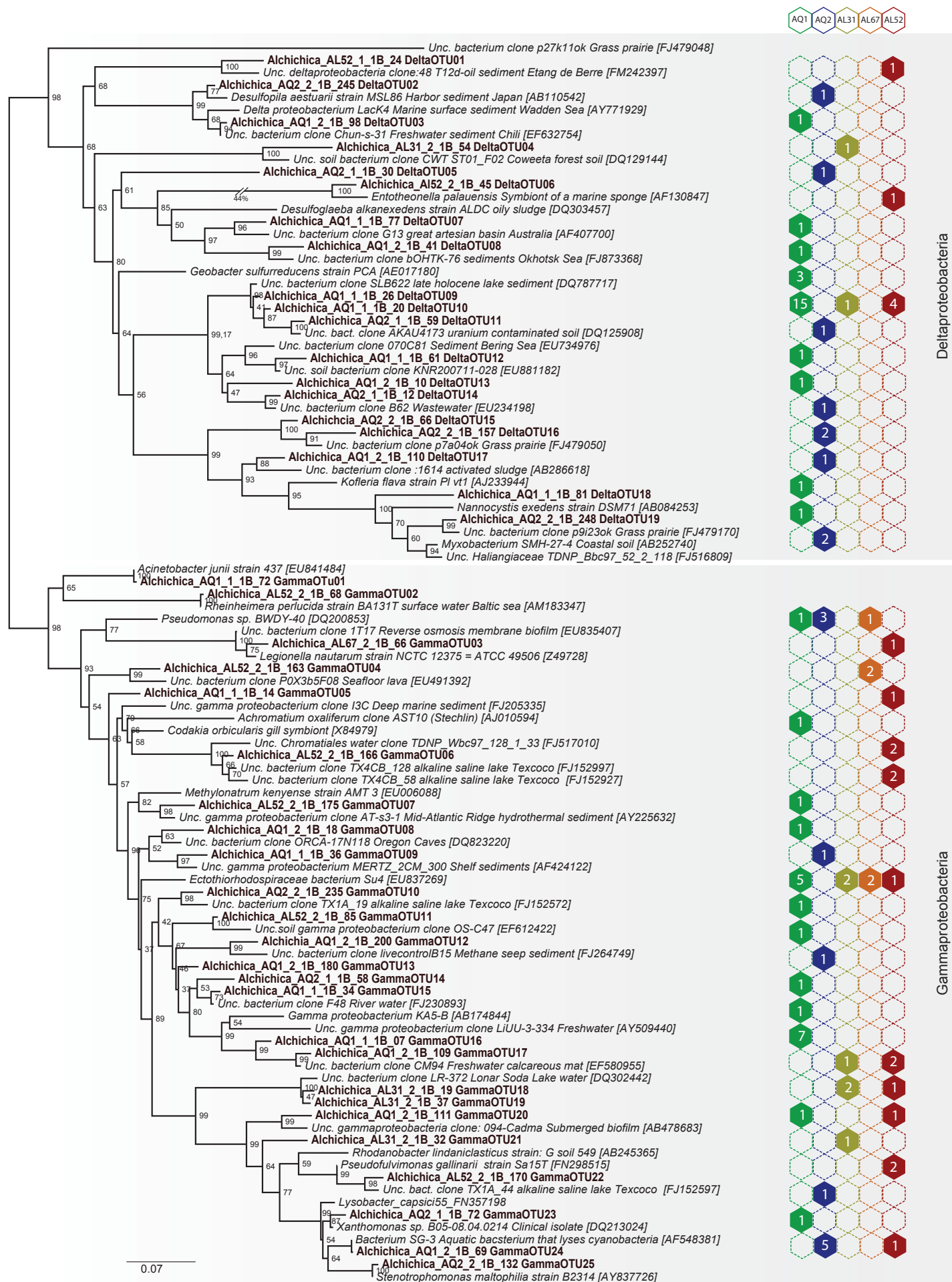




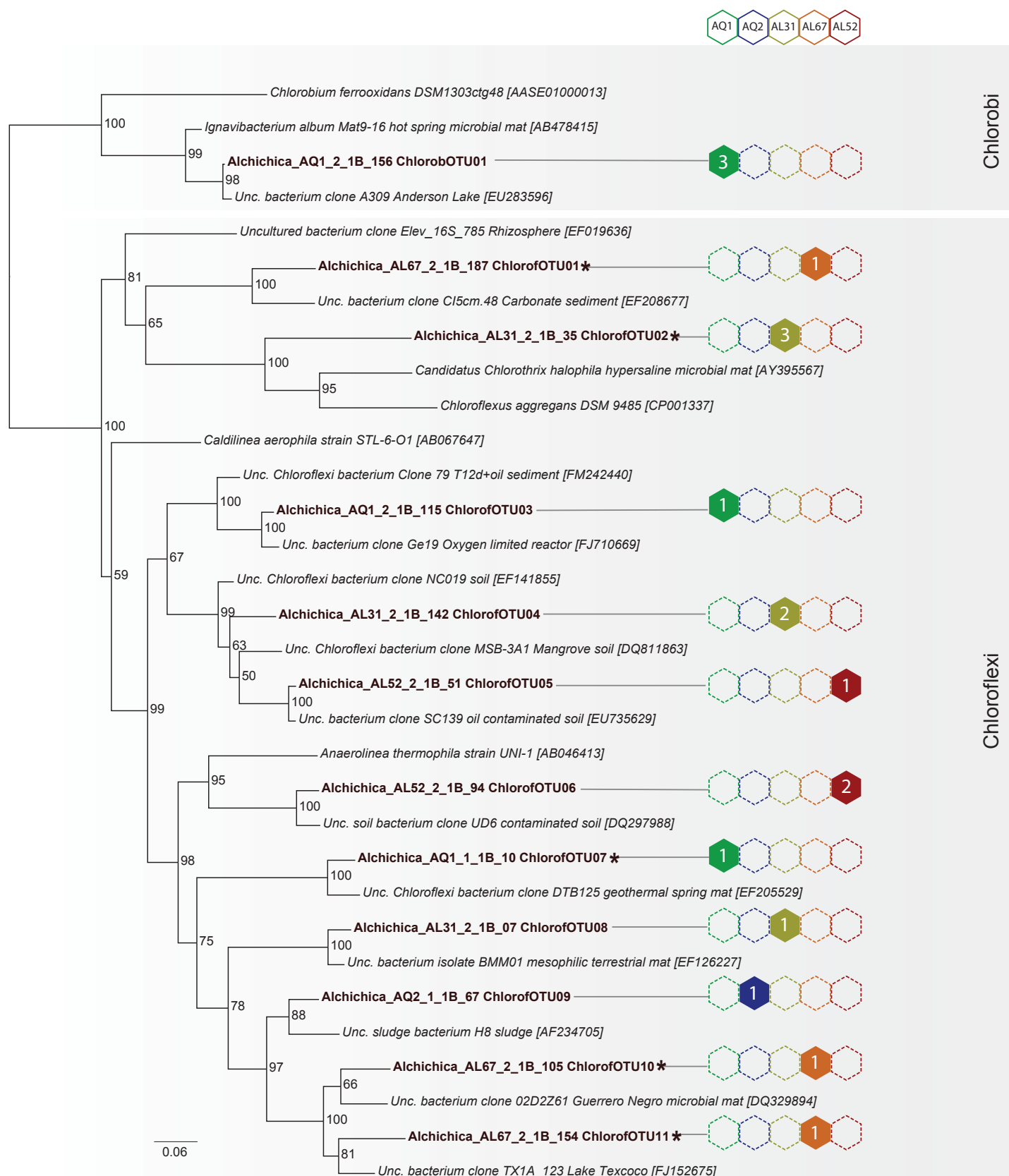
**Figure S2.** Cluster analysis of DGGE fingerprints of bacteria associated to Alchichica microbialites. The name and depth of each sample are given on the right. AQ1 and AQ2 correspond to samples from laboratory aquaria. The scale bar above the dendrogram shows distances (%) between samples based on presence/absence of bands. Grey bars at nodes indicate the standard deviation. Bands labeled with capital letters were cut for sequencing. Samples labeled with an asterisk were chosen for detailed molecular diversity analyses.



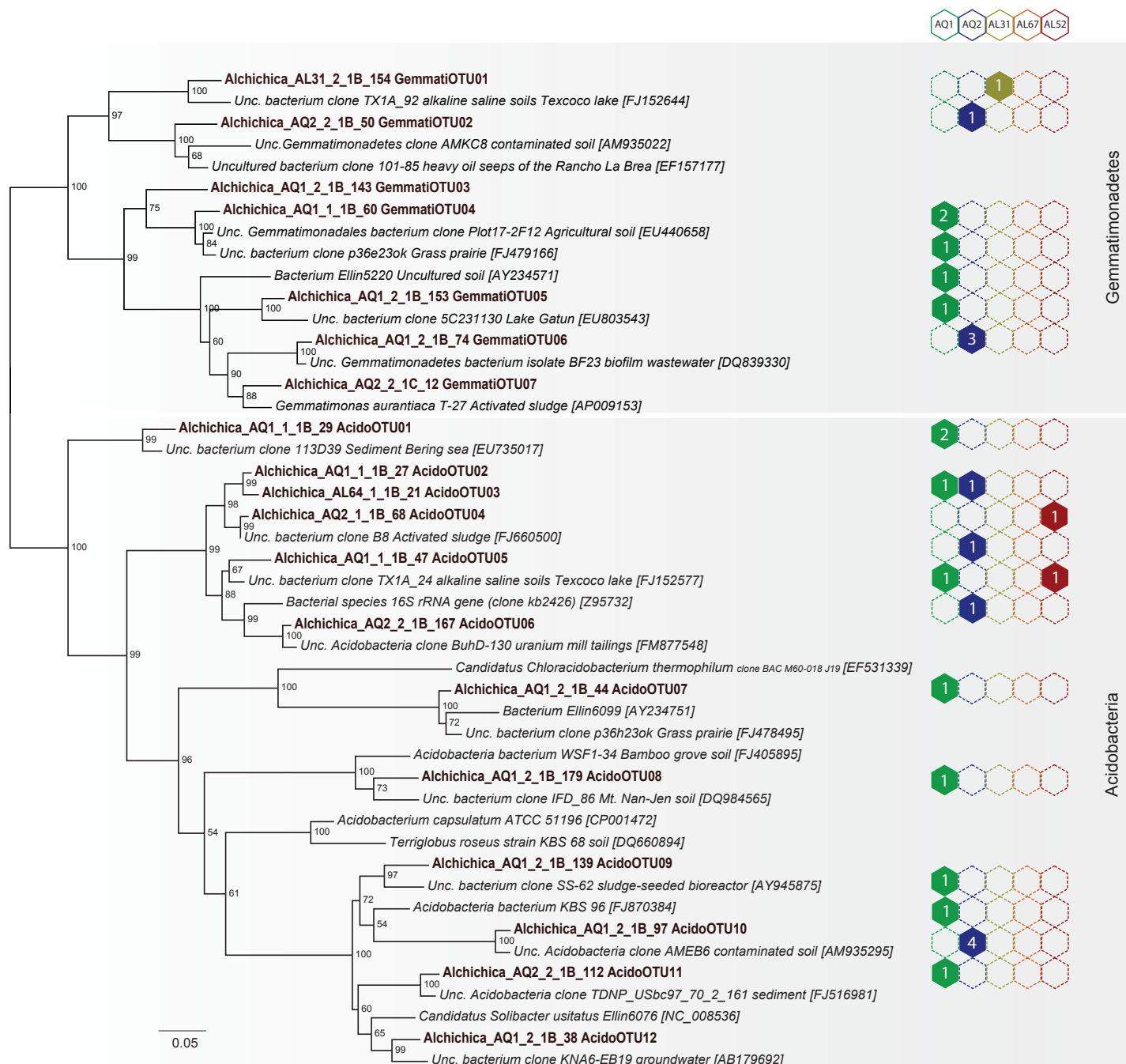




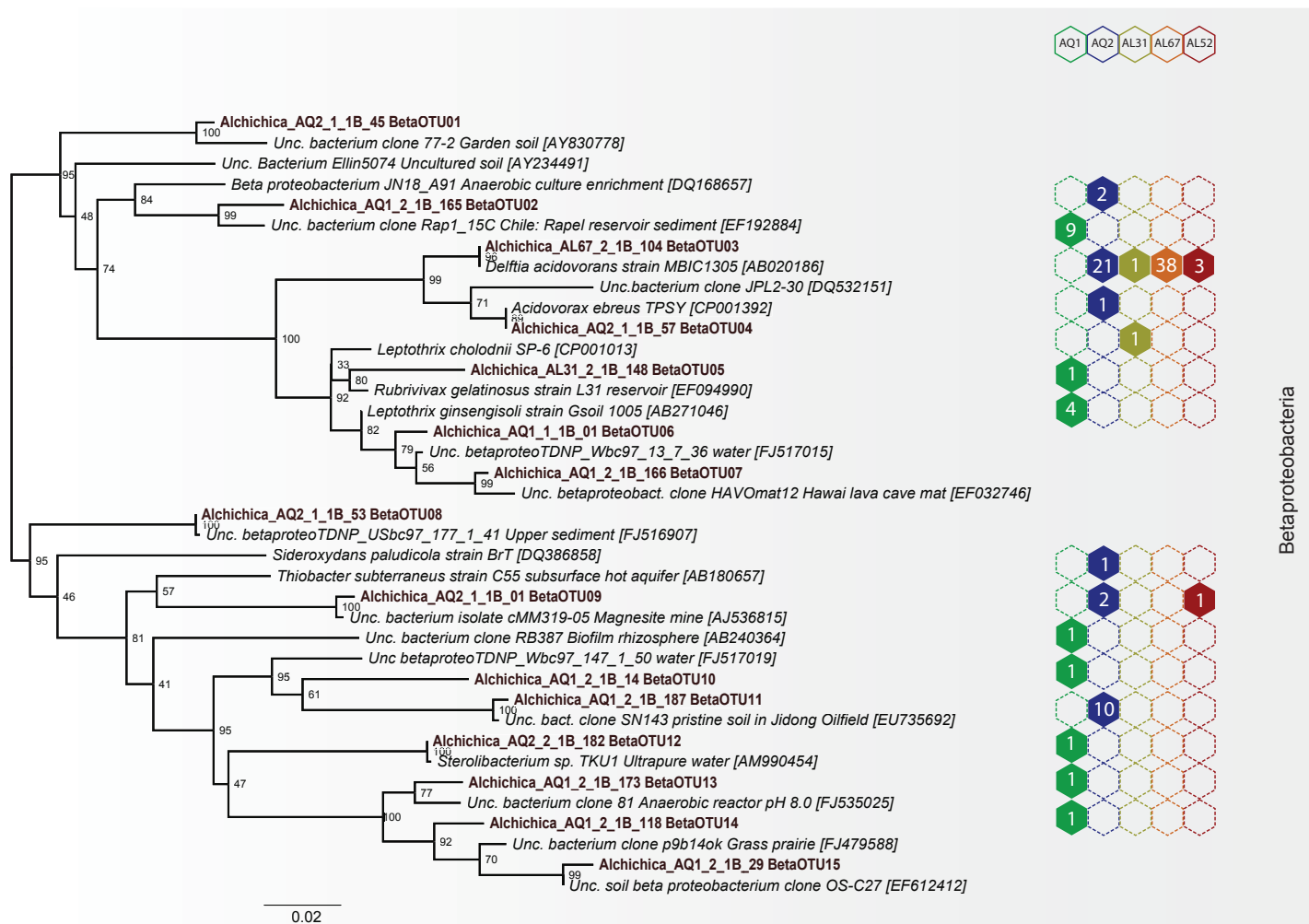
**Figure S4.** Maximum likelihood (ML) phylogenetic tree of SSU rDNA sequences of Deltaproteobacteria and Gammaproteobacteria from Alchichica microbialites. Numbers at nodes indicate bootstrap values. Sequences from this study are in bold. Numbers of clones retrieved from each sample for each OTU are given on the right. The scale bar indicates the number of substitutions per site for a unit branch length.



**Figure S5.** Maximum likelihood phylogenetic tree of SSU rDNA sequences of Chloroflexi and Chlorobi from Alchichica microbialites. Numbers at nodes indicate bootstrap values. Sequences from this study are in bold. Numbers of clones retrieved from each sample for each OTU are given on the right. Asterisks indicate OTUs also identified in DGGE patterns. The scale bar indicates the number of substitutions per site for a unit branch length.

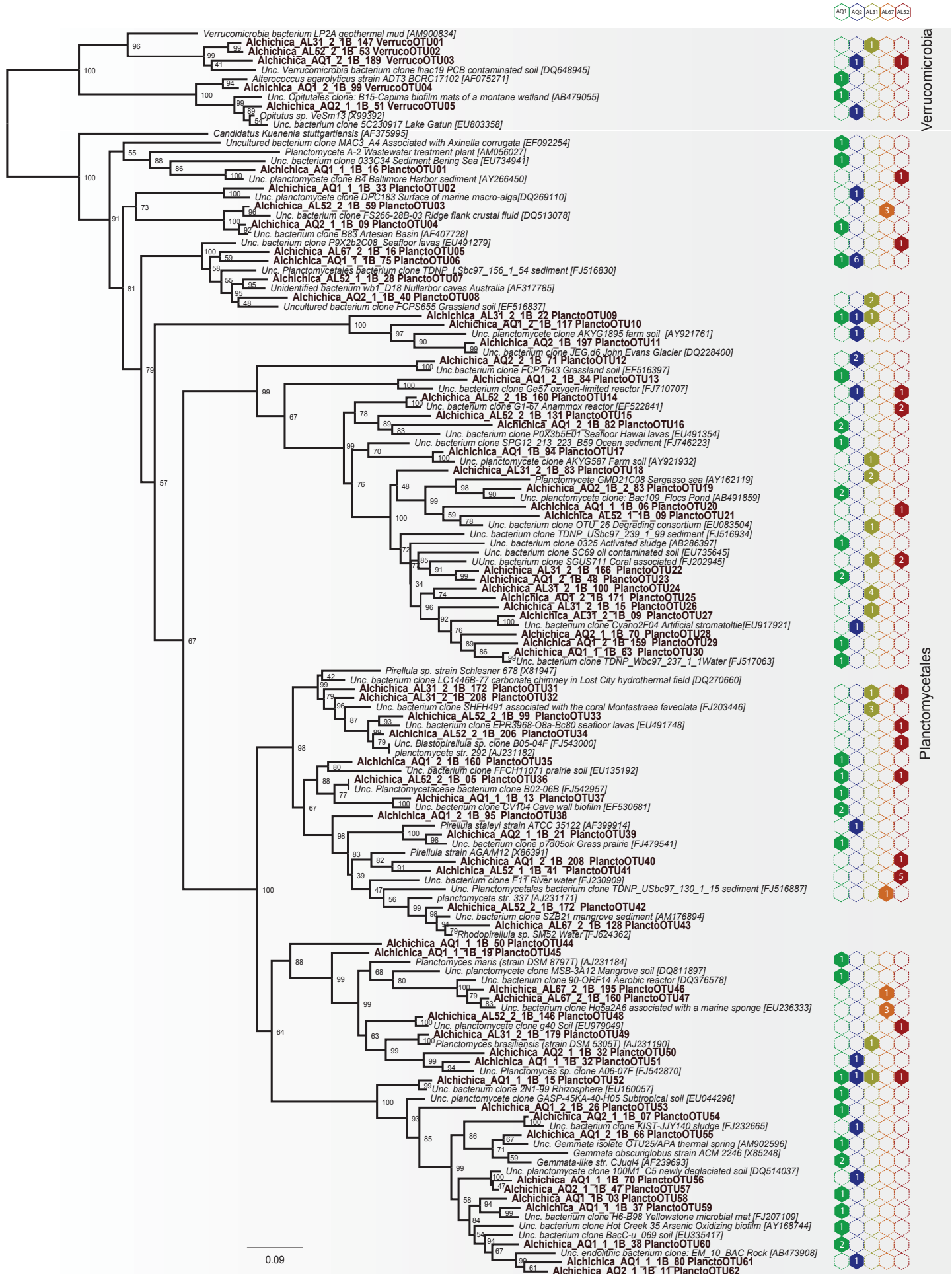


**Figure S6.** Maximum likelihood (ML) phylogenetic tree of SSU rDNA sequences of Gemmatimonadetes and Acidobacteria from Alchichica microbialites. Numbers at nodes indicate bootstrap values. Sequences from this study are in bold. Numbers of clones retrieved from each sample for each OTU are given on the right. The scale bar indicates the number of substitutions per site for a unit branch length.

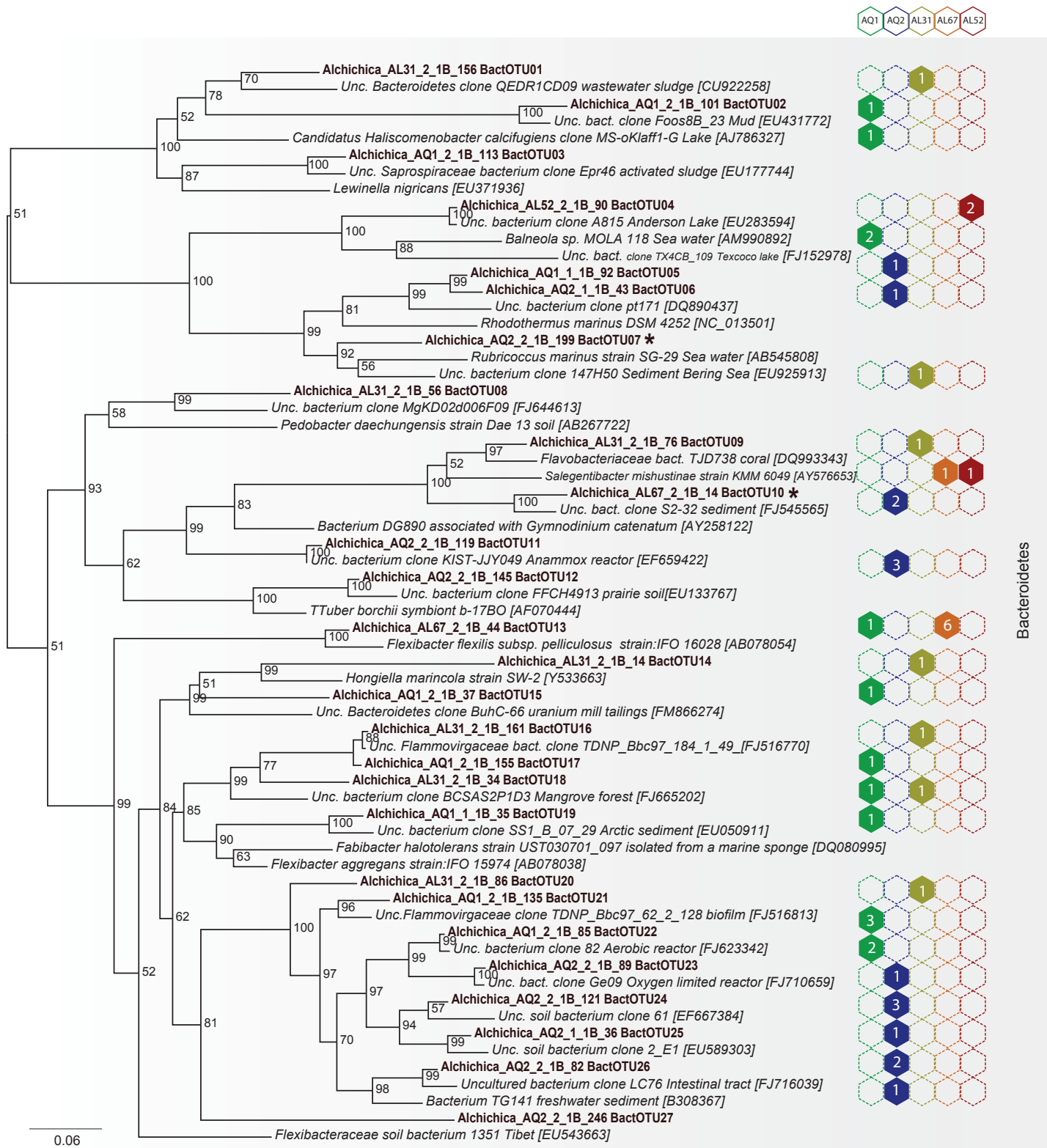


**Figure S7.** Maximum likelihood (ML) phylogenetic tree of SSU rDNA sequences of Betaproteobacteria from Alchichica microbialites. Numbers at nodes indicate bootstrap values. Sequences from this study are in bold. Numbers of clones retrieved from each sample for each OTU are given on the right. The scale bar indicates the number of substitutions per site for a unit branch length.

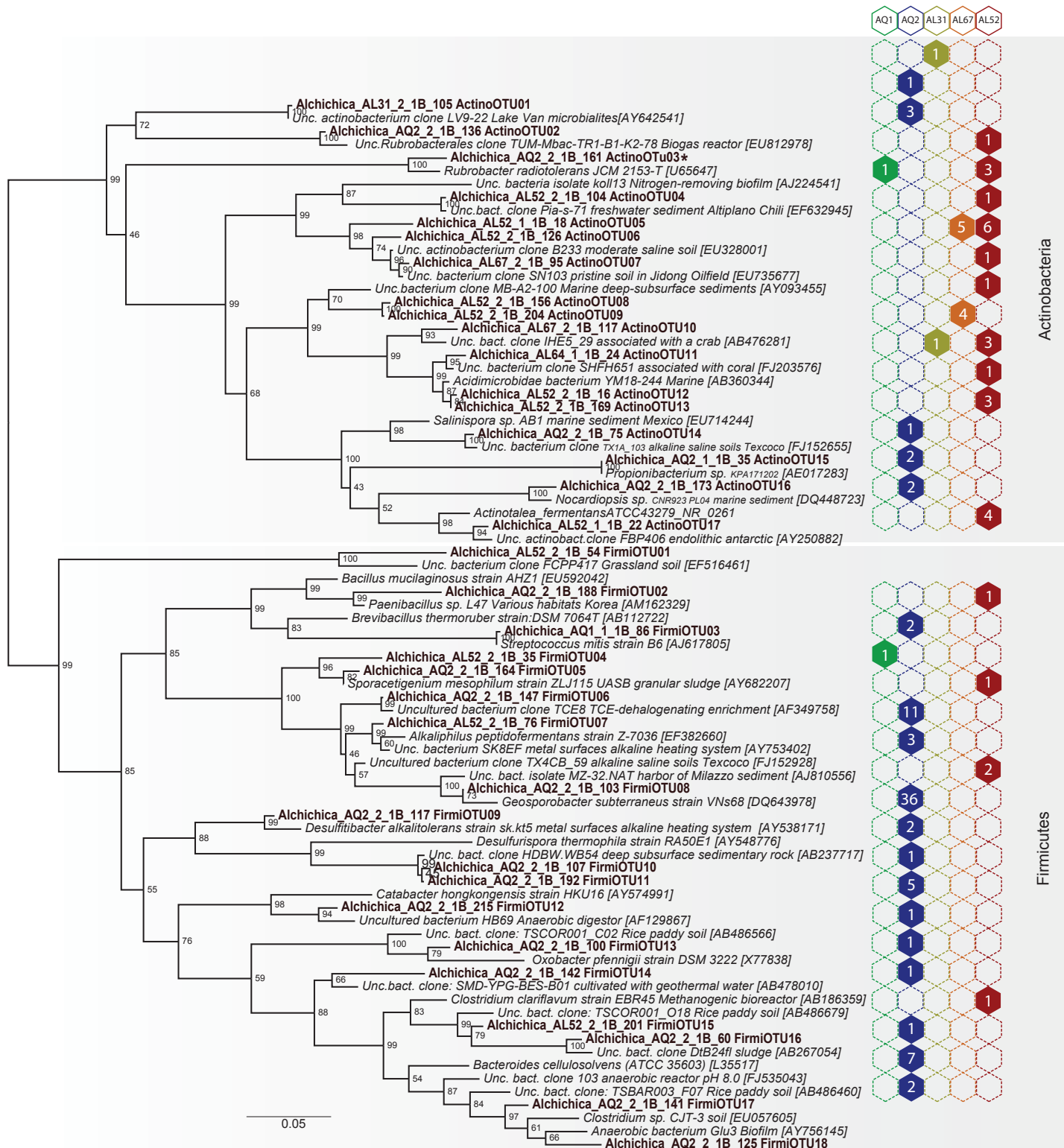




**Figure S8.** Maximum likelihood (ML) phylogenetic tree of SSU rDNA sequences of Planctomycetales and Verrucomicrobia from Alchichica microbialites. Numbers at nodes indicate bootstrap values. Sequences from this study are in bold. Numbers of clones retrieved from each sample for each OTU are given on the right. The scale bar indicates the number of substitutions per site for a unit branch length.

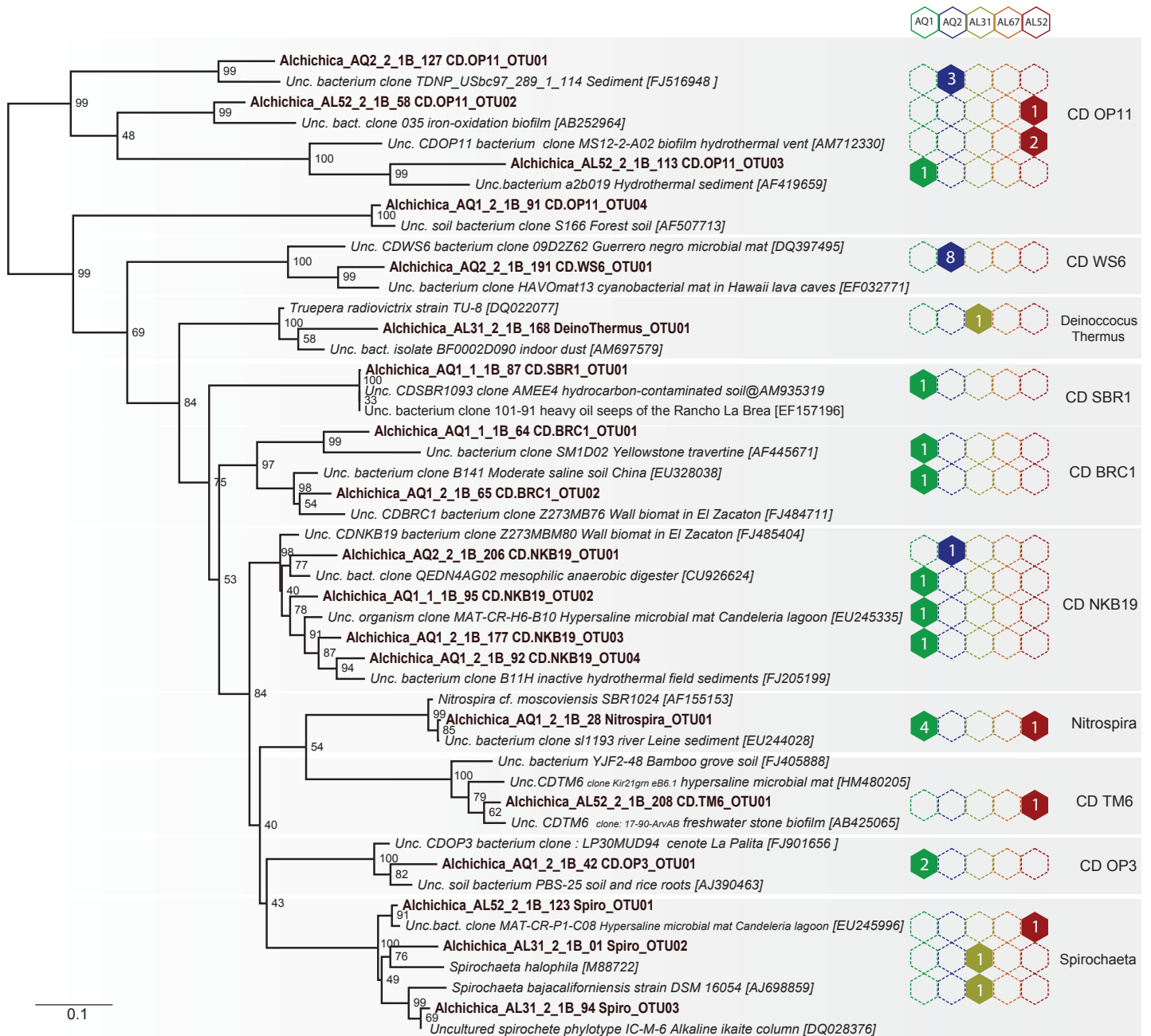


**Figure S9.** Maximum likelihood (ML) phylogenetic tree of SSU rDNA sequences of Bacteroidetes from Alchichica microbialites. Numbers at nodes indicate bootstrap values. Sequences from this study are in bold. Numbers of clones retrieved from each sample for each OTU are given on the right. Asterisks indicate OTUs also identified in DGGE patterns. The scale bar indicates the number of substitutions per site for a unit branch length.



**Figure S10.** Maximum likelihood (ML) phylogenetic tree of SSU rDNA sequences of Actinobacteria and Firmicutes from Alchichica microbialites. Numbers at nodes indicate bootstrap values. Sequences from this study are in bold. Numbers of clones retrieved from each sample for each OTU are given on the right. Asterisks indicate OTUs also identified in DGGE patterns. The scale bar indicates the number of substitutions per site for a unit branch length.



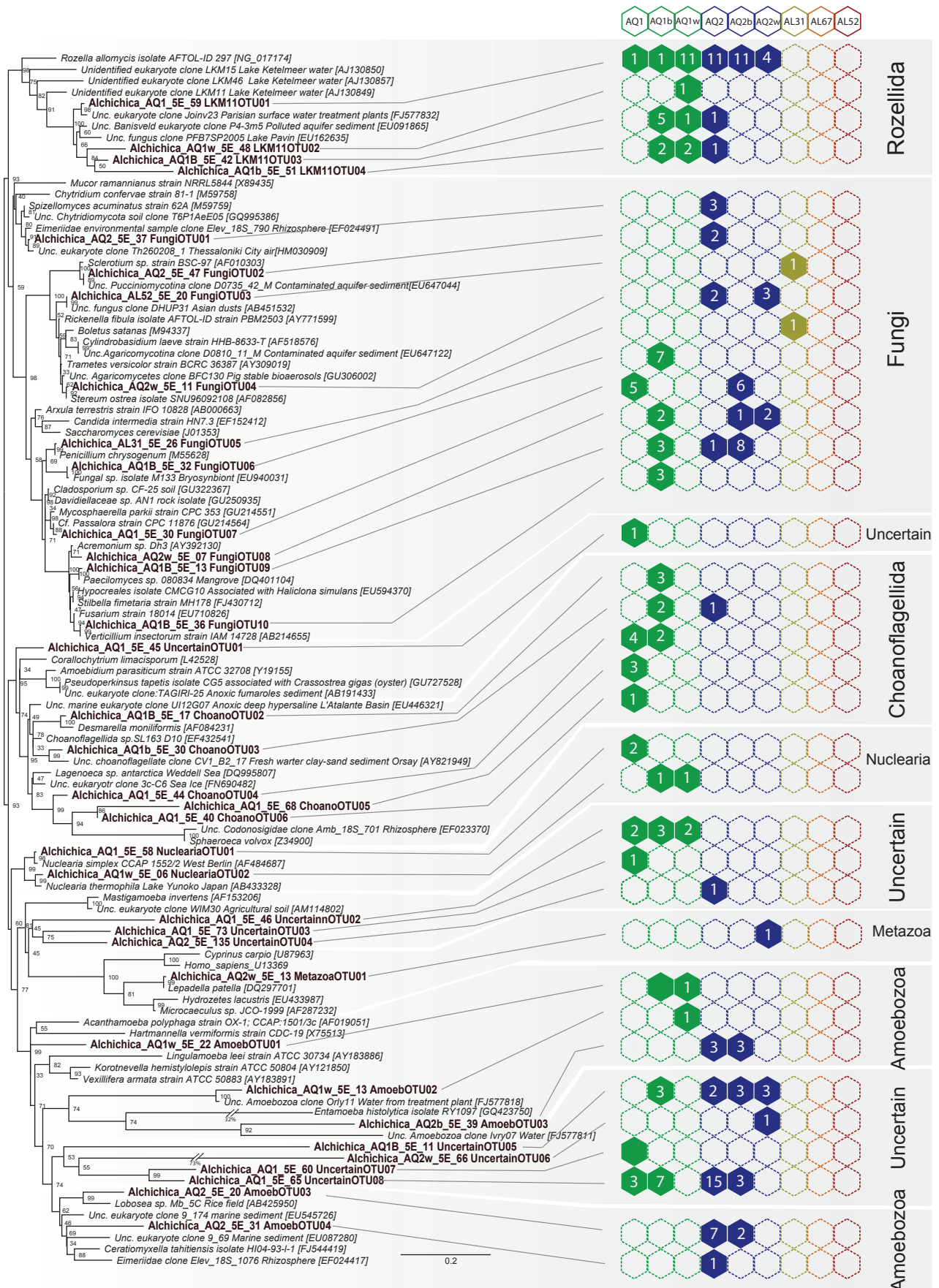


**Figure S11.** Maximum likelihood (ML) phylogenetic tree of SSU rDNA sequences of CD OP11, CD WS6, Deinococcus-Thermus, CD SBR1, CD BRC1, CD NKB19, Nitrospira, CD TM6, CD OP3 and Spirochaeta from Alchichica microbialites. Numbers at nodes indicate bootstrap values. Sequences from this study are in bold. Numbers of clones retrieved from each sample for each OTU are given on the right. The scale bar indicates the number of substitutions per site for a unit branch length.





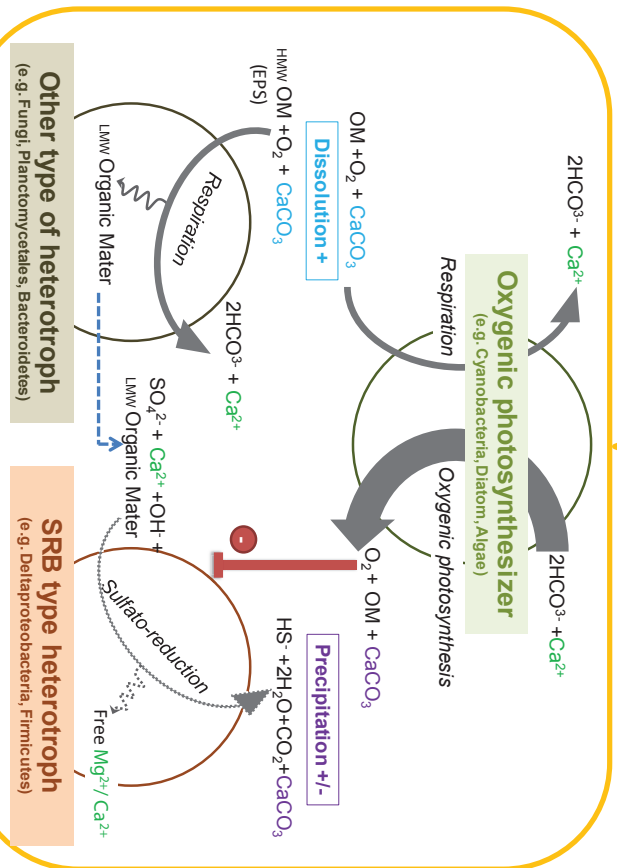
**Figure S12.** Maximum likelihood (ML) phylogenetic tree of SSU rDNA sequences of Archaea from Alchichica microbialites. Numbers at nodes indicate bootstrap values. Sequences from this study are in bold. Numbers of clones retrieved from each sample for each OTU are given in brackets. The scale bar indicates the number of substitutions per site for a unit branch length.



**Figure S13.** Maximum likelihood (ML) phylogenetic tree of SSU rDNA sequences of Unikonta (Amoebozoa plus Opisthokonta) from Alchichica microbialites. Numbers at nodes indicate bootstrap values. Numbers of clones retrieved from each sample for each OTU are given on the right. The scale bar indicates the number of substitutions per site for a unit branch length.



## Oxygenic photosynthesis



## Anoxygenic photosynthesis

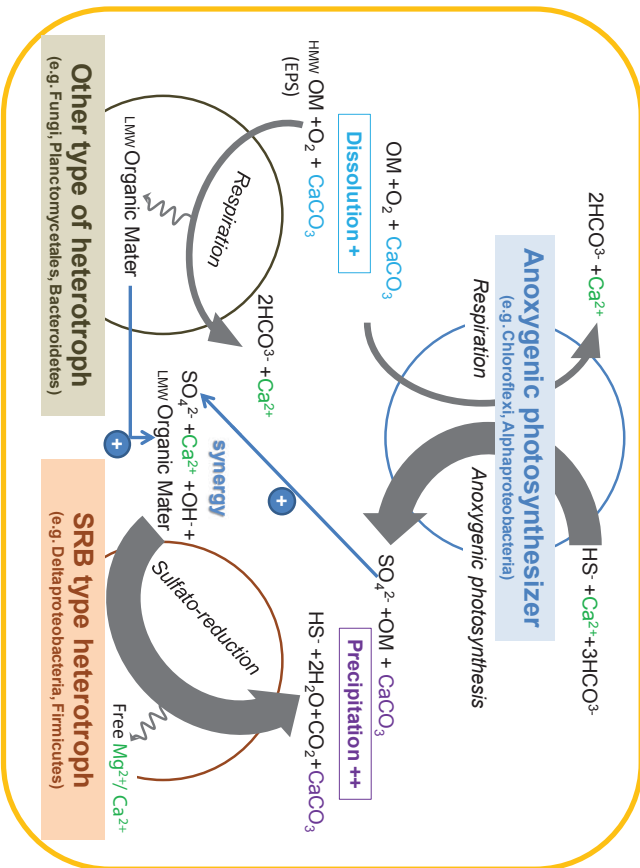


Figure S14. Couradeau et al.

## CHAPITRE 2

# Précipitation extracellulaire de carbonates par les cyanobactéries

### Remords posthume

Lorsque tu dormiras, ma belle ténébreuse,  
Au fond d'un monument construit en marbre noir,  
Et lorsque tu n'auras pour alcôve et manoir  
Qu'un caveau pluvieux et qu'une fosse creuse ;

Quand la pierre, opprimant ta poitrine peureuse  
Et tes flancs qu'assouplit un charmant nonchaloir,  
Empêchera ton cœur de battre et de vouloir,  
Et tes pieds de courir leur course aventureuse,

Le tombeau, confident de mon rêve infini  
(Car le tombeau toujours comprendra le poète),  
Durant ces grandes nuits d'où le somme est banni,

Te dira : " Que vous sert, courtisane imparfaite,  
De n'avoir pas connu ce que pleurent les morts ? "  
- Et le ver rongera ta peau comme un remords.

*Charles Baudelaire (1821-1867), Les fleurs du mal*

## CHAPITRE 2

La première partie nous a permis de mettre en évidence que les microbialites d'Alchichica sont formés de deux phases minérales carbonatées (aragonite et hydromagnésite) et que les biofilms qui les recouvrent sont ceux classiquement retrouvés associés aux microbialites, c'est-à-dire dominés par les protéobactéries et les cyanobactéries.

Or, la photosynthèse oxygénique réalisée par les cyanobactéries est un métabolisme capable d'induire la précipitation des minéraux carbonatés (*Dupraz et al. 2005*) (Introduction II-B-3). De plus il a été montré dans certains exemples que ce mécanisme pouvait contribuer de façon majeure à l'accrétion du microbialite (*Thompson et al. 1990*). C'est pourquoi afin d'aller plus loin dans la compréhension de la formation des microbialites d'Alchichica, nous avons choisi de cibler en priorité l'étude des relations entre les cyanobactéries et les minéraux carbonatés décrits précédemment.

### I. Résumé de l'article n°2

#### **« Étude par microscopie de la calcification de cyanobactéries dans des microbialites modernes »**

##### **A. Contexte & Objectifs**

Il existe de nombreuses études mettant en relation les cyanobactéries et la précipitation de carbonates, à la fois dans des systèmes naturels (e.g. *Krumbein et al. 1979; Arp et al. 1999a; Merz-Preiss et al. 1999; Pratt 2001; Planavsky et al. 2009; Pentecost et al. 2010*) et expérimentaux (*Obst et al. 2009*). Ces études montrent que différentes souches de cyanobactéries appartenant à des ordres différents (Nostocales, Oscillatoriales et Chroococcales) sont impliquées dans la précipitation de minéraux carbonatés, qui eux-mêmes présentent des minéralogies et textures variables.

L'analyse de la diversité microbienne associée aux microbialites d'Alchichica (chapitre 1) a permis de conclure que les deux ordres de cyanobactéries qui dominent les biofilms associés aux microbialites d'Alchichica sont les Oscillatoriales et les Pleurocapsales. Nous avons donc cherché de façon systématique à reconnaître ces deux types morphologiques de cyanobactéries dans les échantillons et à caractériser leurs relations avec l'aragonite et

## CHAPITRE 2

l'hydromagnésite des microbialites d'Alchichica. Les Oscillatoriales sont caractérisées par une morphologie filamenteuse alors que les Pleurocapsales forment des pseudo-filaments constitués de cellules de tailles irrégulières (*Rippka 1988*). Nous avons remarqué qu'il existait une association préférentielle entre les cyanobactéries de l'ordre des Pleurocapsales et l'aragonite dans les échantillons d'Alchichica.

L'association entre les Pleurocapsales et les minéraux carbonatés a déjà été soulignée plusieurs fois dans les études concernant les microbialites modernes. Il s'agit de Pleurocapsales soit endolithiques (*AL-Thukair 1994; Macintyre et al. 2000; Reid et al. 2000b; Havemann et al. 2008*) soit associées au biofilm externe mais en lien étroit avec la partie indurée (*Arp et al. 2003; Arp et al. 2004; Mobberley et al. 2011*). On peut alors se demander quels sont les liens entre cet ordre de cyanobactéries et les minéraux carbonatés ? Est-ce que toutes les Pleurocapsales croissent en association avec la partie indurée du microbialite ? Sont-elles toutes capables de forer le minéral ou d'induire la précipitation de carbonates ? L'étude présentée ici porte sur un cas de biominéralisation extracellulaire induite par des colonies de Pleurocapsales.

Par ailleurs, il est également intéressant d'étudier la calcification des cyanobactéries dans le cadre de la recherche et de la reconnaissance des calcimicrobes<sup>4</sup> (Introduction I-B-3). Il apparaît important de comprendre à partir d'exemples actuels ce qu'est un fossile de cyanobactérie, ce que l'on peut dire de son mode de formation à partir de son observation et enfin quel est le devenir de la matière organique lors du processus de fossilisation ?

L'étude présentée ici a été réalisée grâce au couplage de différentes techniques de microscopie et de spectroscopie. La microscopie confocale a été utilisée pour sa pertinence dans la description des microorganismes auto-fluorescents tels que les cyanobactéries. Elle a été couplée à la microscopie électronique (SEM) associée à la spectroscopie EDX qui allie résolution spatiale et possibilité de déterminer la composition élémentaire des phases minérales. La préparation de lames FIB et leur observation en TEM nous renseigne sur la texture des phases minérales jusqu'à la nano-échelle et peut également être couplée à des analyses de chimie élémentaire (EDX). Enfin la spectro-microscopie STXM apporte des informations cruciales notamment sur la spéciation du carbone à la nano-échelle et permet donc de s'intéresser à la matière organique et à son évolution de façon qualitative.

---

<sup>4</sup> Calcimicrobe : microfossile de cyanobactérie calcifiée

## CHAPITRE 2

Des données supplémentaires montrant les relations entre la partie minérale et d'autres microorganismes photosynthétiques sont présentées à la fin de cette partie. Une dernière section présente des données préliminaires sur un autre mécanisme de fossilisation de microorganismes. Ces données ont été acquises sur un échantillon de microbialite émergé d'Alchichica singulier enrichi en fer (lui conférant une couleur marron) contrairement à tous les autres échantillons présentés dans ce travail qui proviennent de microbialites de couleur blanche (dominés par l'hydromagnésite).

### **B. Principaux résultats & Éléments de discussion**

Les colonies de Pleurocapsales sont progressivement encroûtées dans l'aragonite. La précipitation a d'abord lieu au niveau de la surface des cellules. Les baguettes d'aragonite poussent radialement par rapport à celle-ci. Des couches concentriques de baguettes d'aragonite se mettent en place et remplissent l'espace intercellulaire. Finalement l'intérieur de la cellule collapse ou se minéralise à son tour par la précipitation d'une seconde génération de cristaux d'aragonite plus massifs.

Le minéral qui précipite autour des Pleurocapsales est l'aragonite alors que la phase majoritaire constituant les microbialites est l'hydromagnésite. On peut alors imaginer qu'il existe un contrôle local au niveau du micro-environnement formé par les Pleurocapsales qui induit la précipitation d'un carbonate de calcium plutôt qu'un carbonate de magnésium. Cette hypothèse devra être confirmée par la mise en place de tests expérimentaux. On pourrait par exemple envisager d'isoler des colonies de Pleurocapsales et de doser le calcium et le magnésium associé. Il serait également envisageable de réaliser des marquages en utilisant des fluorochromes afin de localiser les ions calcium, voire même de les quantifier. Enfin on pourrait travailler sur des souches cultivées de Pleurocapsales proche phylogénétiquement de celles identifiées dans les microbialites d'Alchichica (chapitre 1) et étudier la façon dont leurs EPS chélatent les cations (*Braissant et al. 2007*).

Il est possible de suivre le devenir de la matière organique lors des premiers stades de la fossilisation. Au départ la matière organique reste associée au corps cellulaire. Ensuite, la matière organique apparaît plus dispersée ; c'est alors essentiellement la différence de texture entre les deux générations d'aragonite qui permet le diagnostic de la présence d'un microfossile de cellule de Pleurocapsales.

## CHAPITRE 2

Cette étude montre que dans ce cas la biosignature que constitue la matière organique est dispersée rapidement lors du processus de fossilisation. Un microfossile formé de cette façon ne pourra donc pas être conservé sous la forme d'une inclusion micrométrique de matière organique. Ce travail ouvre de nouvelles perspectives sur la recherche et la reconnaissance de microfossiles. L'étude à nano-échelle de la texture des phases minérales pourrait permettre de diagnostiquer ce genre de microfossile dans le registre fossile.

L'étude de l'encroûtement de colonies de Pleurocapsales a montré qu'il existe un biais taxonomique induit par la fossilisation. Parmi toute la diversité de cyanobactéries décrite (Chapitre 1), seules les Pleurocapsales semblent capables d'induire la précipitation d'aragonite et d'être ainsi fossilisées.



## II. Manuscrit de l'article n°2 (en préparation)

*Geobiology*

### **Microscopy study of cyanobacterial calcification in modern microbialites**

Estelle Couradeau<sup>1,2,3</sup>, Karim Benzerara<sup>2</sup>, Emmanuelle Gérard<sup>3</sup>, Imène Estève<sup>2</sup>, David Moreira<sup>1</sup>, and Purificación López-García<sup>1</sup>

**Running title: Taphonomy of modern cyanobacteria**

#### **ABSTRACT**

The search for fossils of microbial cells in the geological record has been a long time challenge causing multiple debates. Part of the problem comes from the difficulty to identify such microfossils unambiguously, since they can be morphologically confounded with abiotic biomorphs. One route to improve our capability to identify such traces consists in studying fossilization processes affecting bacteria in modern settings. With that purpose, we studied the initial stages of fossilization of cyanobacterial cells in modern microbialites from Lake Alchichica (Mexico). Lake Alchichica is a Mg-rich hyperalkaline crater lake (pH 8,9) containing living stromatolites composed of aragonite [CaCO<sub>3</sub>] and hydromagnesite [Mg<sub>5</sub>(CO<sub>3</sub>)<sub>4</sub>(OH)<sub>2</sub>•4(H<sub>2</sub>O)]. Cyanobacteria comprise most of the microbialite biomass. Scanning electron microscopy analyses coupled with confocal laser scanning microscopy observations were used to co-localize cyanobacterial cells and associated minerals. These observations showed that cells from the order Pleurocapsales specifically become encrusted within aragonite with an apparent preservation of cell ultrastructures. Encrustation gradients from living to totally encrusted cells spanning distances of a few hundred of micrometers were observed. Cells with increasing levels of encrustation along these gradients were studied down to the nm-scale using a combination of focused ion beam (FIB) milling, transmission electron microscopy (TEM) and scanning transmission x-ray microscopy (STXM) at the C, O and N K-edges. Two different types of aragonite crystals differing by their morphology were observed: one type is composed of nano-crystals with a crystallographic orientation perpendicular to the cell wall. Another type of aragonite is composed of larger crystals that fill progressively the inner part of the cells. Organic matter is first pushed away from the cells

by crystal growth. Then, it progressively disappears, keeping the same spectroscopic signature. In the most advanced stages of fossilization, only the textural organization of the two types of aragonite records the initial cells. We propose a model of the early fossilization process of these cyanobacteria and their associated organic molecules.

### INTRODUCTION

The search for fossils of microbial cells (microfossils) in the geological record has been a long time challenge causing multiple debates (*Schopf et al. 1987; Brasier et al. 2002; Schopf et al. 2002; Brasier et al. 2005; Schopf et al. 2010*). Part of the problem comes from the difficulty to identify microfossils unambiguously, since they are small and their morphology can be confounded with abiotic biomorphs (*Garcia-Ruiz et al. 2003*). Microbialites, which are organosedimentary formations resulting from the microbially-mediated precipitation of carbonates for the most part (*Burne et al. 1987*), have been favorite targets for the search of such fossils (*Riding 2000*). Indeed, it has been traditionally suggested that the formation of ancient stromatolites was mediated by oxygenic photosynthesis, performed by cyanobacteria, based on comparison with modern analogues (*Altermann 2006; Riding 2006a; Aloisi 2008*). A few alternative scenarios involving purely abiotic processes (*Lowe 1994; Grotzinger et al. 1996; McLoughlin et al. 2008*) or anoxygenic photosynthesis (*Bosak et al. 2007*) have been tentatively proposed. However, stromatolites are considered by many studies as some of the oldest traces of life on Earth (*Grotzinger et al. 1999; Altermann 2004*) (*Allwood et al. 2006; Altermann 2006*).

Putative cyanobacterial microfossils have been reported in the Warrawoona stromatolitic formation (3.65 Ga) (*Schopf et al. 1987*) but their biogenicity and even more their cyanobacterial affiliation have been questioned (*Brasier et al. 2002*). Interestingly, while microfossils of calcified cyanobacteria are commonly found in the geological record since the base of the Cambrian, Precambrian stromatolites often lack microfossils, the earliest undisputed occurrence being *Girvanella* at 700 Ma (*Riding 2006a*).

This lack of cyanobacterial microfossils in Precambrian rocks despite the fact that stromatolites were well-developed and cyanobacteria were already present, has been called the “Precambrian enigma” (*Riding 1982; Arp et al. 2001*). There has been an ongoing effort to understand the processes leading to microfossil formation in order to elucidate this “enigma”.

## CHAPITRE 2

It is assumed that the formation of cyanobacterial microfossils results from the local impregnation of their sheath by carbonate precipitation which is induced by the photosynthetic activity of the cells (*Riding 1982; Riding 2006a*). Cyanobacteria import carbon under the form of  $\text{HCO}_3^-$  especially in environments where dissolved  $\text{CO}_2$  is limiting. This can be mediated by transporters of varying efficiency (*Jansson et al. 2010*).  $\text{HCO}_3^-$  is then converted to  $\text{CO}_2$  and  $\text{CO}_3^{2-}$ , or depending on the authors,  $\text{CO}_2$  and  $\text{OH}^-$ . The conversion between  $\text{HCO}_3^-$  and  $\text{CO}_2$  is catalyzed by specific enzymes called carbonic anhydrases (CA) that vary significantly among different species (*Kupriyanova et al. 2011*).  $\text{CO}_2$  is then fixed by photosynthesis into organic carbon while  $\text{CO}_3^{2-}$  and/or  $\text{OH}^-$  are exported to the extracellular medium. This raises the saturation of the surrounding solution with various carbonate minerals, depending on the cation content of the extracellular solution. An additional source of oversaturation is provided by an active export of  $\text{Ca}^{2+}$  from the cells coupled with import of  $\text{H}^+$  (*Belkin et al. 1987*). Finally, some cyanobacteria cells produce extracellular polymeric substance (EPS) that form a diffusion-limited micro-environment where pH and other chemical gradients (e.g.  $[\text{Ca}^{2+}]$ ) build up. As a result,  $\text{CaCO}_3$  crystals precipitate around the cells and entomb them (e.g., (*Riding 2006a; Pentecost et al. 2010*)). Alternatively, it has been suggested that the production of large amounts of exopolymeric substances (EPS) by cyanobacteria may inhibit carbonate precipitation by sequestering cations. In that case, prior degradation of EPS by heterotrophic bacteria may be necessary for carbonate precipitation to occur (*Dupraz et al. 2005*).

Two types of causes, highly debated, have thus been proposed to explain the lack of such impregnation in the Precambrian. In a first one, the chemical composition of the Precambrian ocean did not provide suitable conditions for calcium carbonate precipitation in cyanobacterial sheaths (*Arp et al. 2001*). A high concentration of carbonate ions (related to the high partial pressure of carbon dioxide at that time) and a low concentration of calcium ions may have inhibited the production of an alkalinity excess directly at the surface of the cell preventing the cell encrustation. Calcium carbonate precipitation occurred far from the cell which was consequently not preserved as a microfossil. Other authors argue that biological parameters such as sheath EPS composition (*Dupraz et al. 2005; Obst et al. 2009*) and/or cell activity (*Kupriyanova et al. 2011*) are also critical parameters, and that ancestral cyanobacteria may have not been able to provoke extracellular carbonate nucleation and precipitation efficiently (*Jansson et al. 2010*).

The mechanism of formation of calcified cyanobacteria by sheath impregnation is still debated in several occurrences including among the oldest microfossils. For instance, the formation of the *Girvanella*-type microfossils widespread in Paleozoic formations has been questioned. Based on petrographic evidence, some authors have proposed that the calcification took place postmortem (*Pratt 2001; Pratt 2002*); others suggested alternatively that it was a result of living cell metabolic activity (*Arp et al. 2002*). In any case, all authors agree on the fact that a better understanding of processes involved in cyanobacterial calcification in modern settings is mandatory.

Here, we observed the specific calcification of cells of *Pleurocapsales* by aragonite in the modern microbialites of the hyperalkaline Lake Alchichica. We characterized the early steps of this process down to the nm-scale using a combination of confocal laser scanning microscopy (CLSM), scanning and transmission electron microscopies, focused ion beam milling and synchrotron-based scanning transmission x-ray microscopy. The documentation of the evolution of mineral growth and resulting mineral textures as well as the fate of organic matter in these systems provides an unprecedented picture of calcified cyanobacterial cells at the nm-scale providing an important modern reference for future studies of fossil calcified cells

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Sample collection and preparation**

Fragments of modern microbialites were collected in sterile Zip plastic bags at 10cm, 3m, 4m, 5m, 8m and 14m depth in Lake Alchichica. Alchichica is a hyperalkaline lake (pH~8.9) in Mexico, which harbors a high density of living microbialites composed mostly of hydromagnesite and aragonite (*Kaźmierczak et al. 2011*). Microbial diversity of biofilms associated to these samples has been studied previously by molecular methods based on SSU rRNA gene analyses (*Couradeau et al. 2011*). It revealed a high diversity of microorganisms, especially bacteria. Biofilm appeared dominated by cyanobacteria in term of biomass. They were also diverse, 38 phylotypes were identified and found to be affiliated to seven of the eight orders described for cyanobacteria. Microbialite fragments were fixed in the laboratory by incubation in a 4% formaldehyde solution (methanol free, ultra pure; Polysciences, Inc.) during 4 h at 4°C then washed in Phosphate Buffered Saline (PBS) solution and finally stored in (1/1) ethanol/PBS at -20°C. A millimeter-sized fragment of each sample was stained first

## CHAPITRE 2

by calcein at a concentration of 0,1 mg/ml for 48 h at 4°C, then by DAPI at 1 µg/ml for 2 h at room temperature. Samples were then dehydrated through a graded series of ethanol/water solutions (30%, 50%, 70%, 90%, and 100%), and progressively embedded in hard grade LR-white resin (Polysciences, Inc.). This was followed by incubation at 4°C for 18 h in (1/1) then (2/1) mixture of LR-white/ethanol and finally in pure LR-white resin. After 3 h at room temperature, samples were embedded in pure LR-white resin for 1 h at 40°C and then for 24 h at 60°C. Transverse cross sections were cut using a diamond wire before polishing using diamond powder at ¼ µm.

### **Confocal laser scanning microscopy (CLSM)**

Transverse polished sections were observed using an Olympus FluoView™ FV1000 confocal laser scanning microscope. The microscope is equipped with a 405 nm laser diode, and multi-line argon (458 nm, 488 nm, and 515 nm), helium-neon-green (543 nm) and helium-neon-red (633 nm) lasers. Fluorescence images were obtained with concomitant excitation at wavelengths of 405 nm, 488 nm, and 543 nm and collection of the emitted fluorescence between 425-475 nm, 500-530 nm, and 560-660 nm, respectively with a spectral resolution of 2 nm.

### **Scanning electron microscopy and FIB milling**

The section of the microbialite sample collected at a 4m depth and analyzed by CLSM was coated with gold-palladium and observed by scanning electron microscopy (SEM). Images were collected in backscattered and secondary electron modes using a *Zeiss Ultra 55 FEG-SEM* operating at 10 kV with a 30 µm aperture and a working distance of 8 mm. Elemental compositions were determined by x-ray energy dispersive spectrometry (EDX) using an EDS QUANTAX detector and the software ESPRIT. EDXS analyses were operated using a 20 keV acceleration voltage, a 60 µm aperture and a working distance of 7,5 mm.

Two ultrathin foils transparent to electrons were prepared by FIB milling using the FIB “lift-out” technique (*Heaney et al. 2001*) using a Zeiss dual FIB-NEON 40EsB. A 30 kV Ga<sup>+</sup> beam operated at ~5 nA was used for the initial steps of the milling. Progressive excavation from both sides of the section area was performed through repeated milling of steps. Depth of milling was approximately ~7 microns. An in-situ micromanipulator was attached to the foil using FIB-assisted platinum deposition and the foil was liberated from the substrate by a U-cut milling pattern. The foil was transferred to an Omniprobe grid and welded to it. The final

## CHAPITRE 2

finest thinning of the section was performed with  $\text{Ga}^+$  beam operated at 100 pA current. The final foil measured 15  $\mu\text{m}$  in length,  $\sim 6 \mu\text{m}$  in width and  $\sim 100\text{-}200\text{nm}$  in thickness.

### **Transmission electron microscopy (TEM)**

TEM observations were carried out on a JEOL2100F microscope operating at 200kV, equipped with a field emission gun, a high resolution UHR pole piece, and a US4000 GATAN camera. Selected area electron diffraction (SAED) was performed using the smallest aperture allowing retrieval of diffraction patterns from a  $100 \times 100 \text{ nm}^2$  area.

### **Scanning transmission X-Ray microscopy (STXM)**

Scanning transmission x-ray microscopy (STXM) and x-ray absorption near-edge structure (XANES) spectroscopy measurements were carried out on Molecular Environmental Science 11.0.2.2 beamline at the Advanced Light Source (ALS, Berkeley, USA). Measurements were performed at the C, O and N K-edges and at the Ca  $\text{L}_{2,3}$ -edges, following the procedures described in (*Bluhm et al. 2006*). ALS storage ring was operated at 1.9 GeV and 500 mA current. Energy calibration was done using the well-resolved 3p Rydberg peak at 294.96 eV of gaseous  $\text{CO}_2$  and the  $\text{L}_3$  most intense peak of calcite at 349.3 eV (*Rieger et al. 1986*). Methods used for STXM data acquisition and analysis and examples of STXM applications can be found, for example, in (*Benzerara et al. 2004*) and (*Obst et al. 2009*). AXis2000 software was used to extract XANES spectra from image stack measurements and STXM map construction.

## **RESULTS**

### **SEM and CLSM analyses of cyanobacteria-mineral assemblages**

Bulk XRD analyses (Fig. S1) show that Alchichica microbialites collected at diverse depth are mostly composed of two main phases: aragonite ( $\text{CaCO}_3$ ) and hydromagnesite ( $\text{Mg}_5(\text{CO}_3)_4(\text{OH})_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ). These two mineral phases can be clearly discriminated by SEM in the backscattered electron mode (BSE): hydromagnesite appears as light grey areas composing the major part of the samples (70% to 90% of the surface of the sections observed), while aragonite appears as bright discontinuous patches located preferentially at the surface of the samples in contact with microbial biofilms. The biofilms appear as a dark

grey discontinuous layers lying on the surface of the microbialites and measuring 10 to 500 micrometers in thickness (Fig. 1A). CLSM observations on the same areas show that the biofilms in contact with aragonite patches are mostly composed of cyanobacterial cells identified as *Pleurocapsales* based on 1) their autofluorescence, 2) their typical pseudo-filamentous morphology and 3) their previous identification by molecular methods in the same samples (Fig. 1C)(*Couradeau et al. 2011*). *Pleurocapsales* cells encrusted in aragonite were observed. Such occurrences of *Pleurocapsales* encrustation in aragonite have been observed in all the samples (10cm, 3m, 4m, 5m, 8m and 14m) by coupling CLSM and SEM analyses. Here, only data obtained on the sample collected at 4 m, which are representative of all the other samples, are presented (Fig 2). Increasing levels of encrustation could be followed over a distance of 100  $\mu\text{m}$  starting at the surface of the microbialites, in the biofilm with non-encrusted cells down to areas where cells are completely encrusted (Fig. 2A). Calcification starts by the formation of a mineral layer around the cell wall while cells seem to keep a significant portion of their organic content. Then the inner part of the cells calcifies and eventually only the cell wall remains as for the organic content of encrusted cells. Whatever the degree of encrustation is, walls of encrusted cells can be detected by SEM (Fig 1B). Moreover, completely encrusted cells show some fluorescence by CLSM (Fig 1C). At this stage, encrusted cells forms some sort of pavement in the aragonite.

In order to get further insight in the mineral-cell assemblages down to the nm-scale, two FIB foils were cut across encrusted cells (see locations on Fig. 2A, Fig. S2): FIB foil A was cut across partially encrusted cells located close to the surface of the microbialite; FIB foil B was cut across completely encrusted cells 44 micrometers deeper within the aragonite patch.

### **STXM study of organic matter in the FIB foils**

The relative distribution of carbonates and organic carbon within the FIB foils was studied using scanning transmission x-ray microscopy (STXM). XANES spectra were measured at the C K-edge on both FIB foils A and B (Fig. 3). For each foil, two types of XANES spectra were evidenced. One type of XANES spectrum is typical of calcium carbonates and shows a major peak at 290.2 eV that is attributed to  $1s\text{-}\pi^*$  electronic transitions in carbonate groups (*Benzerara et al. 2006*). The other type of XANES spectrum is characteristic of organic carbon and shows peaks at 284.8, 286.5 and 288.5 eV that can be attributed to aromatic,



ketone and carboxylic functional groups respectively (*Benzerara et al. 2004*). Organic carbon has the same spectroscopic signature in both FIB slices. Carbonates (i.e., aragonite) vs. organic carbon were mapped in the two FIB foils based on their spectroscopic differences. In FIB foil A, two different textures are obtained for organic carbon (Fig.4): some organic carbon appears as homogeneous 3 micrometers wide patches filling the partly encrusted cells; the rest of the organic carbon is diffuse and shows an intimate association with aragonite crystals. Local concentrations of this organic carbon draw contour line delimiting aragonite clusters which likely correspond to the previous boundaries of encrusted cells (Fig 3B). Three encrusted cells were observed in foil A (Fig. 3B). In FIB foil B, one encrusted cyanobacterial cell can be distinguished based on a local concentration of organic carbon (Fig. 3C). Otherwise, most of the organic carbon was diffuse and intimately associated with carbonates. XANES spectra were measured at the O and N K-edges (Fig. S4). Similarly to the observations performed at the C K-edge, only one kind of spectrum was retrieved in organic matter for both FIB foils, indicating that the composition of organic matter in functional groups as detected by XANES spectroscopy does not change with increasing encrustation (Fig. S4).

### **TEM study textural arrangement of aragonite crystals**

Two kinds of aragonite crystals that we call in the following “type 1” and “type 2” aragonite were observed (Fig. 4). “Type 1” aragonite is composed of needle-shaped nanocrystals measuring ~200 nanometers in length and ~25 nm in width (Fig. S4). They are organized as clusters in which all the crystals share a similar crystallographic orientation as evidenced by high resolution TEM observations (Fig 4E). This was further confirmed by selected area electronic diffraction showing arcs of restricted angular stretch suggesting the presence of well crystallized aragonite nanocrystals with a preferential crystallographic orientation (Fig. S4). “Type 2” aragonite was composed of larger prismatic crystals measuring around 250 nm. In the most advance stages of encrustation, each cell was either filled with organic matter or “type 2” aragonite. For all the stages of encrustation, the wall of each *Pleurocapsales* cell was surrounded by “type 1” aragonite needles which were perpendicular to the cell surface and formed a radial crown around the cell (Fig 4C). The addition of radial layers of “type 1” aragonite around the cell lead to the concentric growth pattern observed. Each successive layer in which aragonite needles share a common crystallographic orientation intermediate between the layer located beneath and that located above measure 200 micrometers in width.

This progressive change in crystallographic orientation from one layer to the next one accommodates the transition between two encrusted cells. Interestingly, higher concentration of organic matter was observed (Fig 3B) in these transition areas where aragonite formed around two neighboring Pleurocapsales converge (see dashed line in Fig. 4A & D). The relative distribution of aragonite of “type 1” (outside the cells) and “type 2” (within the cells) is correlated with the location of encrusted cells. Owing to the mineral texture, it is therefore possible to infer the presence of former cells even when encrustation is much advanced and only little organic carbon remains (Fig. 4D-F).

## DISCUSSION

### **Association between Pleurocapsales and aragonite**

A previous analysis of SSU rRNA genes showed that at least 34 phylotypes of Cyanobacteria are present in Alchichica microbialites, including 5 phylotypes of Pleurocapsales (*Couradeau et al. 2011*). One phylotype of Pleurocapsales (Alchichica\_AL52\_2\_1B\_148 CyanoOTU35) was particularly abundant in Alchichica samples (up to 69% of all cyanobacteria in the deepest sample examined) (*Couradeau et al. 2011*). The closest relative of this phylotype was detected in microbialites from Lake Van (*Lopez-Garcia et al. 2005*). Consistently with the results provided by molecular analyses, we were able to observe in the microbialite sections diverse morphotypes of cyanobacteria by CLSM (*Gerard et al. submitted*) including Pleurocapsales that are systematically associated with aragonite.; Close associations between Pleurocapsales and aragonite have been reported by previous studies, e.g., on the Bahamian thrombolitic black mat type (*Mobberley et al. 2011*) or on Satonda microbialites where the *Pleurocapsa-Dermocarpella* zone was associated with aragonite aggregates (*Arp et al. 2003*). Occurrence of permineralization by Mg-calcite followed by fibrous aragonite precipitation in Pleurocapsales cells of Satonda microbialites has also been suggested (*Kempe et al. 1990*); however, this observation has been contested (*Arp et al. 2004*). (*Arp et al. 2004*) replies that there were no supporting evidence of such a permineralization since the precipitation may have been artificial due to an unsuitable treatment of the sample, especially air drying. In Laguna Mormona stromatolites, *Entophysalis* Pleurocapsales permineralization by aragonite is proposed as the most important mechanism of stromatolite accretion (*Horodyski et al. 1975*). Here, Pleurocapsales may thus specifically impact the formation of aragonite and

contribute in that way to the formation of Alchichica microbialites. Intriguingly, Pleurocapsales have also been observed as carbonate microborers (*Ramirez-Reinat et al. 2012*). Permineralization by aragonite has been proposed as an important mechanism contributing to Lake Van microbialites growth, since permineralized cells contribute to the stabilization of the inner part of microbialite chimney forming a carbonate crust (*Kempe et al. 1991*). The two genera *Hyella* and *Solentia* described in the Bahamas stromatolites for example are endolithic and contribute to stromatolites accretion and strengthening by the formation of lithified horizons (*AL-Thukair 1994; Macintyre et al. 2000; Reid et al. 2000b; Havemann et al. 2008*). For example in the case of *Solentia*, it has been shown that boreholes are filled with aragonite that creates cohesive carbonate crusts stabilizing the lateral detritic horizons (*Reid et al. 2000b*). Moreover a large diversity of Pleurocapsales phylotypes have recently been described as members of carbonate endolithic communities (*Ramirez-Reinat et al. 2012*).

### Sequence of Pleurocapsales encrustation

In Alchichica microbialites, encrustation starts *in vivo* in the biofilm. One likely reason is that it is controlled by the cell metabolic activity (*Planavsky et al. 2009*). Chemical processes inducing cell encrustation by calcium carbonates have been proposed by previous studies (*Dupraz et al. 2009*). First, there can be a pH increase in the sheath of cyanobacteria due to production of alkalinity by photosynthetic activity. Providing the presence of cations such as  $\text{Ca}^{2+}$  or  $\text{Mg}^{2+}$  in the extracellular solution, this eventually leads to local over-saturation with various carbonate phases (*Arp et al. 2001*) (*Visscher et al. 1991*). This mechanism may explain the first stage of sheath impregnation by “type 1” aragonite but does not explain the later growth of “type 2” aragonite. Specificity of Pleurocapsales encrustation over the diversity of cyanobacteria may be due to a specific ability of increasing alkalinity in their sheath. The mechanism leading to this raise remain to be determine by experimental studies comparing microenvironment produced by different species of cyanobacteria in relation to their metabolic activity and nature of EPS produced.

Alternatively, post-mortem calcification processes have been suggested by other authors. For example, in modern microbialites from the Tikehau atoll, carbonate may result from *in vivo* photosynthesis-induced biomineralisation as well as pervasive precipitation due to organic matter decay (*Sprachta et al. 2001*). The latter mechanism has been substantiated based on the following observations: living Cyanobacteria produce antibiotic substances

which inhibit heterotrophic degradation of organic matter (*Merz-Preiss 2000*). However, once they die, their organic matter is rapidly degraded by heterotrophic, especially sulphate-reducing, bacteria (*Chafetz et al. 1992*) (*Braissant et al. 2007*). This leads to a local raise of pH and subsequent carbonate precipitation (*Krumbein et al. 1979*). Formation of “type 2” aragonite may occur *post-mortem* following this mechanism. *In vivo* calcification allows the preservation of the size and the morphology of the cells (*Merz-Preiss et al. 1999*). *Post-mortem* calcification (*Bartley 1996*) forms crystals, the growth and resulting morphology of which vary and are only controlled by empty space instead of being controlled by the presence of organic molecules as nucleation points and cell chemical micro-environment (*Chafetz et al. 1992*), (*Riding 2006a*). Formation of “type 2” aragonite within cells may prevent later collapsing during further compaction as suggested previously (*Golubic et al. 1976*).

Whatever the mechanism of encrustation is, the advanced stages still show some traces of the cells under two forms: first, some residual pigments are preserved. Second, the shape of the cells is approximately preserved by the specific textural arrangement of the two types of aragonite crystals.

One remaining question is: why do Pleurocapsales get encrusted by aragonite and not hydromagnesite which is the major carbonate phase found everywhere else in the microbialites? Saturation indices calculated from lake chemistry indicate that the lake is oversaturated with both aragonite and hydromagnesite (*Kaźmierczak et al. 2011*). The orientation of the precipitation reaction towards aragonite instead of hydromagnesite is thus likely due to some kinetics effects. Since we could observe the progressive stages of cell encrustation starting by *in vivo* aragonite calcification in the biofilms, we can exclude a replacement of hydromagnesite by aragonite as suggested by a previous study on Lake Waylungyup (Australia) stromatolites (*Coshell et al. 1998*). A local increase  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$  ratio around Pleurocapsales cells could be one reason explaining why aragonite precipitation is kinetically advantaged over hydromagnesite. Such an increase of the  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$  ratio maybe due to a sequestration of  $\text{Mg}^{2+}$  by Pleurocapsales EPS that would be more efficient than for  $\text{Ca}^{2+}$ . The ability of actively binding calcium ions has been experimentally demonstrated in EPS produced by *Desulfobacterium autotrophicum*, a deltaproteobacterium (*Braissant et al. 2007*). Alternatively, Pleurocapsales cells may be able to export extracellularly  $\text{Ca}^{2+}$  very efficiently which is a frequently observed capability for cyanobacteria which maintain in this way low cytoplasmic  $\text{Ca}^{2+}$  concentrations (*Dominguez 2004*).

### Ecological consequences

Some authors have proposed that extracellular carbonate precipitation by cyanobacteria which buffers the alkalinity produced by photosynthesis may have appeared in response to the decrease of CO<sub>2</sub> partial pressure at the end of the Proterozoic (*Riding 2006a*). In the present case, encrustation within aragonite is leading to cell death. The extracellular precipitation of carbonate may at the same time increase the photosynthesis efficiency and induce the cell death. It is then possible that the production of baeocytes (i.e. small cells resulting from the division by multiple fission of a parental cell) by *Pleurocapsales* since they are mobile and able to disperse (*Waterbury et al. 1978*) may represent an opportunity to escape and colonize another substrate. Baeocytes have been observed at the top of *Pleurocapsales* encrusting area in Alchichica microbialites (*Gerard et al. submitted*).

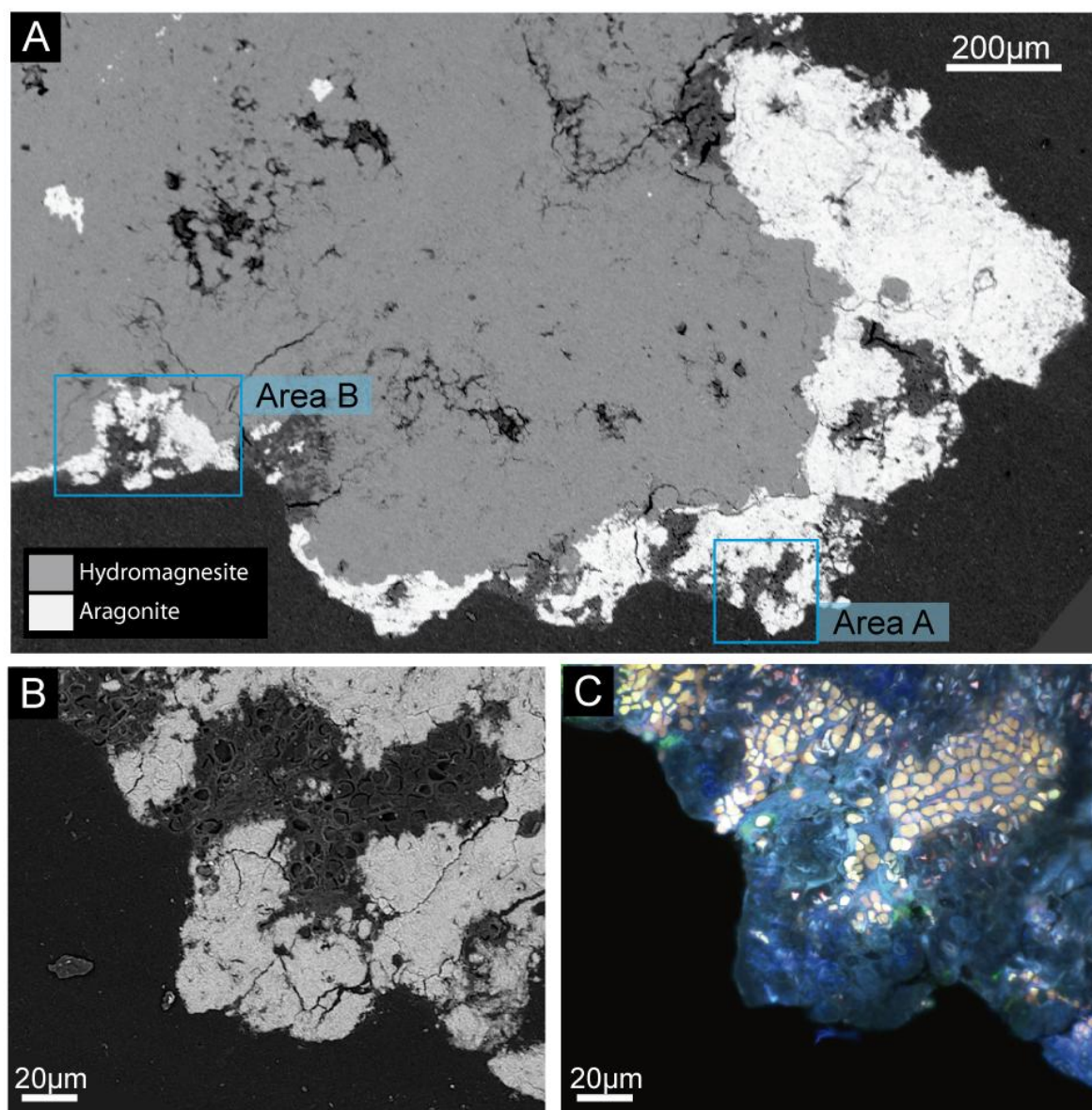
### CONCLUSION

The fossilization pattern of *Pleurocapsales* within aragonite appears to occur in four main steps (Fig. 5). In the first step, the cell is photosynthetically active and modifies the local chemical environment (step 1). Consequently, the sheath experiences an increase of pH that leads to aragonite nucleation (step 2). The nucleation starts close to the cell wall, and needles of aragonite type 1 initially grow perpendicularly to cell surface. The morphology and growth pattern of aragonite type 1 may be controlled by surrounding organic matter (*Braissant et al. 2003*). Clusters of aragonite type 1 fill the space surrounding the cell and their orientation accommodates the transition from one encrusted cell to another (step 3). At this step organic matter is still detectable in the inner part of the cell. The organic matter around the cell that initially corresponded to EPS is now pushed at the borders of cell clusters. In a final step (step 4) the inner part of the cell is filled with aragonite type 2, the crystal size of which indicates a nucleation and growth in a homogenous environment. The organic matter whose residual fluorescence is detected at this step is still present in the cell wall. In the end, the organic matter is diffuse and does not indicate any more the initial organization of *Pleurocapsales* cells. The relative textural organizations of aragonite type 1 vs. aragonite type 2 are the only markers that record the initial ultrastructure and distribution of cells. The stability of this kind of textural biosignature through time remains to be assessed. It has been shown previously that very fine structural (as cell nucleus in eucaryotes (*Huldtgren et al. 2011*) or cell

## CHAPITRE 2

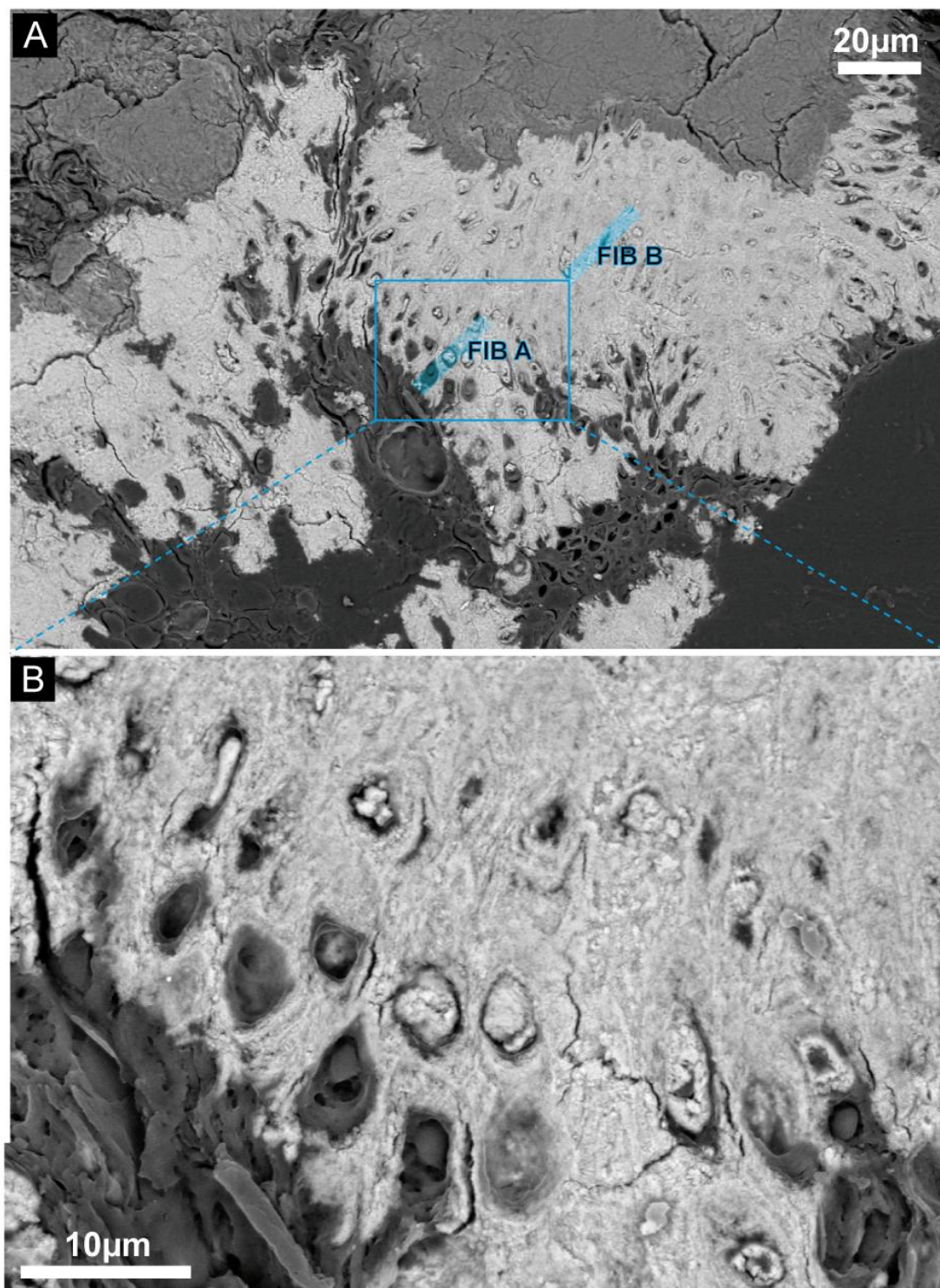
periplasm in bacteria (*Miot et al. 2011*) and textural details can be preserved through geological time, including situations when rocks have been affected by metamorphism (*Bernard et al. 2007; Galvez et al. 2012*). The nano-scale is a relevant scale to look for life signature in ancient rocks especially in rocks supposedly formed by microbes as stromatolites.

## FIGURES

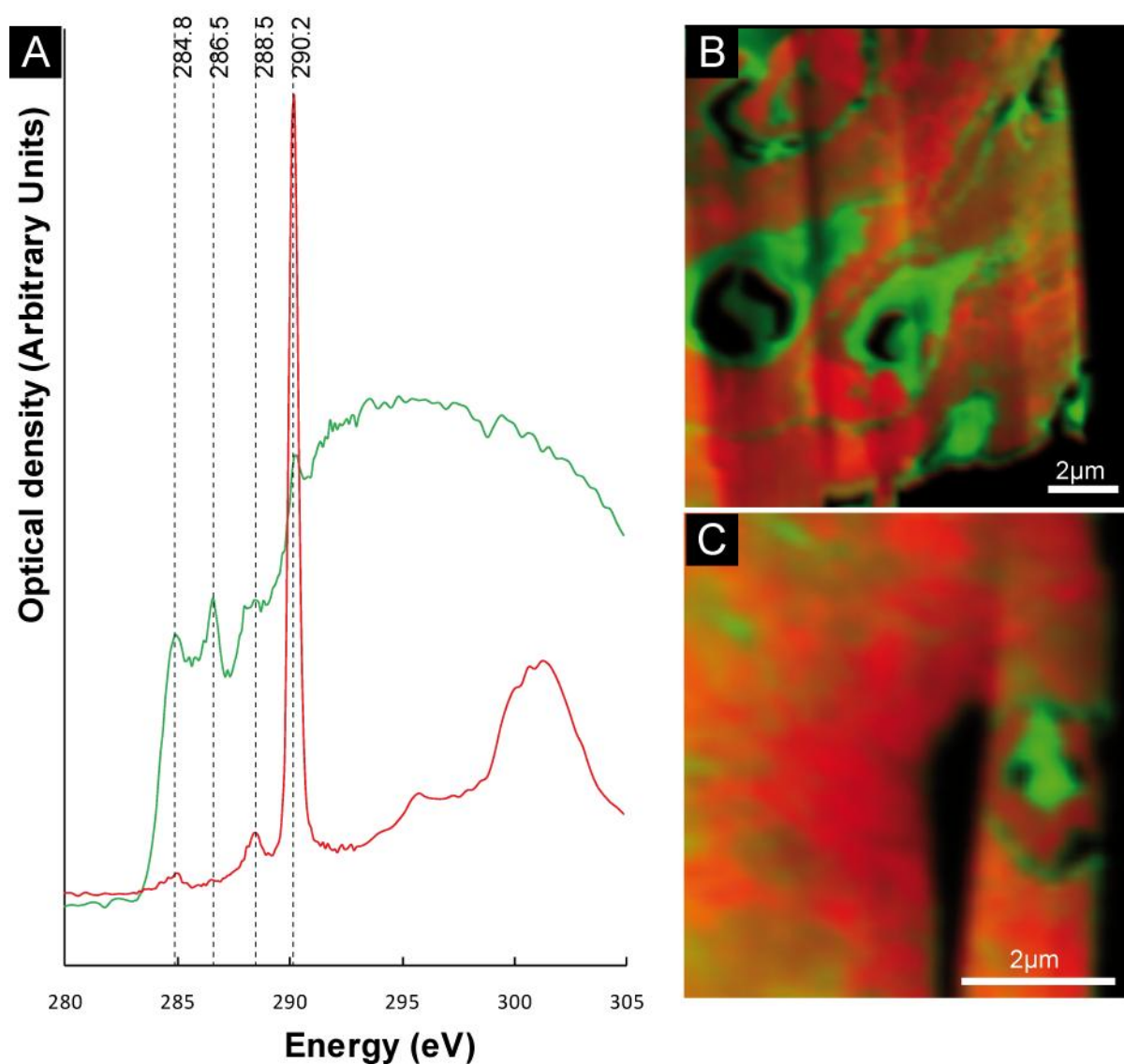


**Figure 1 :** Images 4m microbialite section. (A) SEM (secondary electron mode) picture of the section showing the relative distribution of mineral phases. Aragonite (white) is surrounding the sample while hydromagnesite (light grey) fill the inner part. LR-white resin appears dark-grey around the sample. Pockets of microorganisms are visible into aragonite for instance in Area A and Area B. (B-C) Zoomed pictures of Area A using SEM (B) and CLSM (C). Microorganisms forming pockets into aragonite can be identified as *Pleurocapsales* cells based on morphology and fluorescence. Remaining fluorescence underline cell ghosts in the aragonitic part.



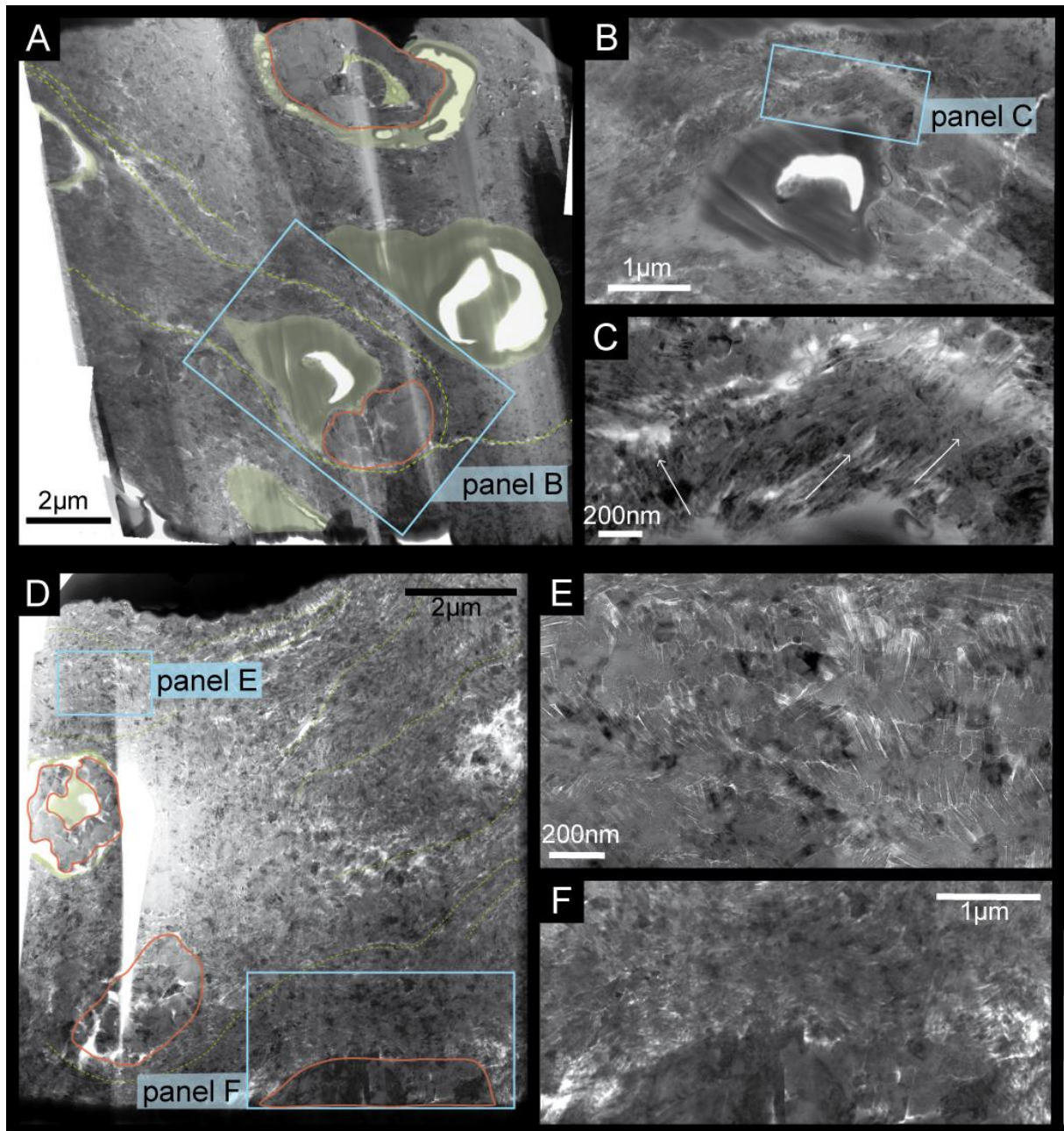


**Figure 2 :** Fossilization gradient of Pleurocapsales cells into aragonite. (A) SEM picture of the Area B marked in Figure 1 showing progressive encrustation of Pleurocapsales cells into aragonite. Localization of FIB sections has been reported. FIB A corresponding to the beginning of the fossilization gradient while FIB B was cut in totally encrusted cells. (B) Zoom picture (SEM) of the Area B showing the textural relation between cells and aragonite. In some cell the inner part remains totally organic while in other only the wall is visible while the inner part is filled by aragonite.

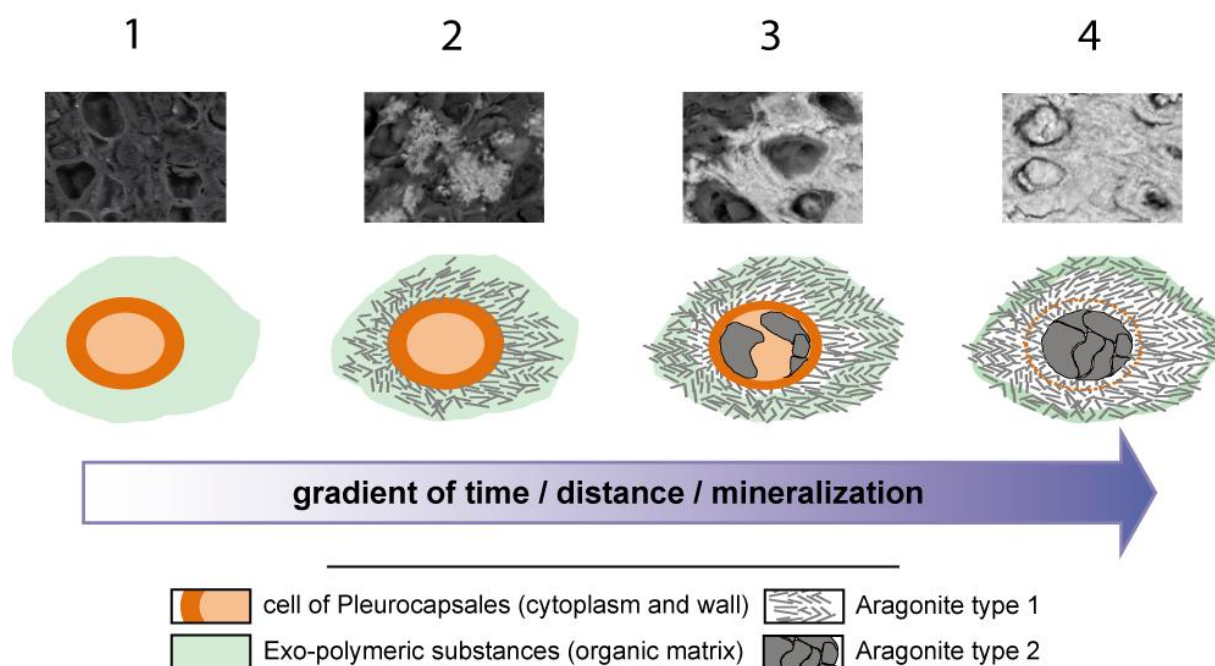


**Figure 3 :** STXM (Scanning transmission x-ray microscopy) at the C-Kedge FIB sections A and B cut across *Pleurocapsales* cells encrusted within aragonite (A) C-Kedge NEXAFS spectra on remnant organic matter composing the cells (green) and surrounding carbonates (red). (B) STXM map with 40 nm spatial resolution showing the distribution of organic matter (green) and carbonate (red) in the FIB foil A. Cell morphology is preserved in these first steps of fossilization. (C) STXM map with 40 nm spatial resolution showing the distribution of organic matter (green) and carbonate (red) in the FIB foil B. One cell can still be discriminate, elsewhere, organic matter and carbonate are mixed.

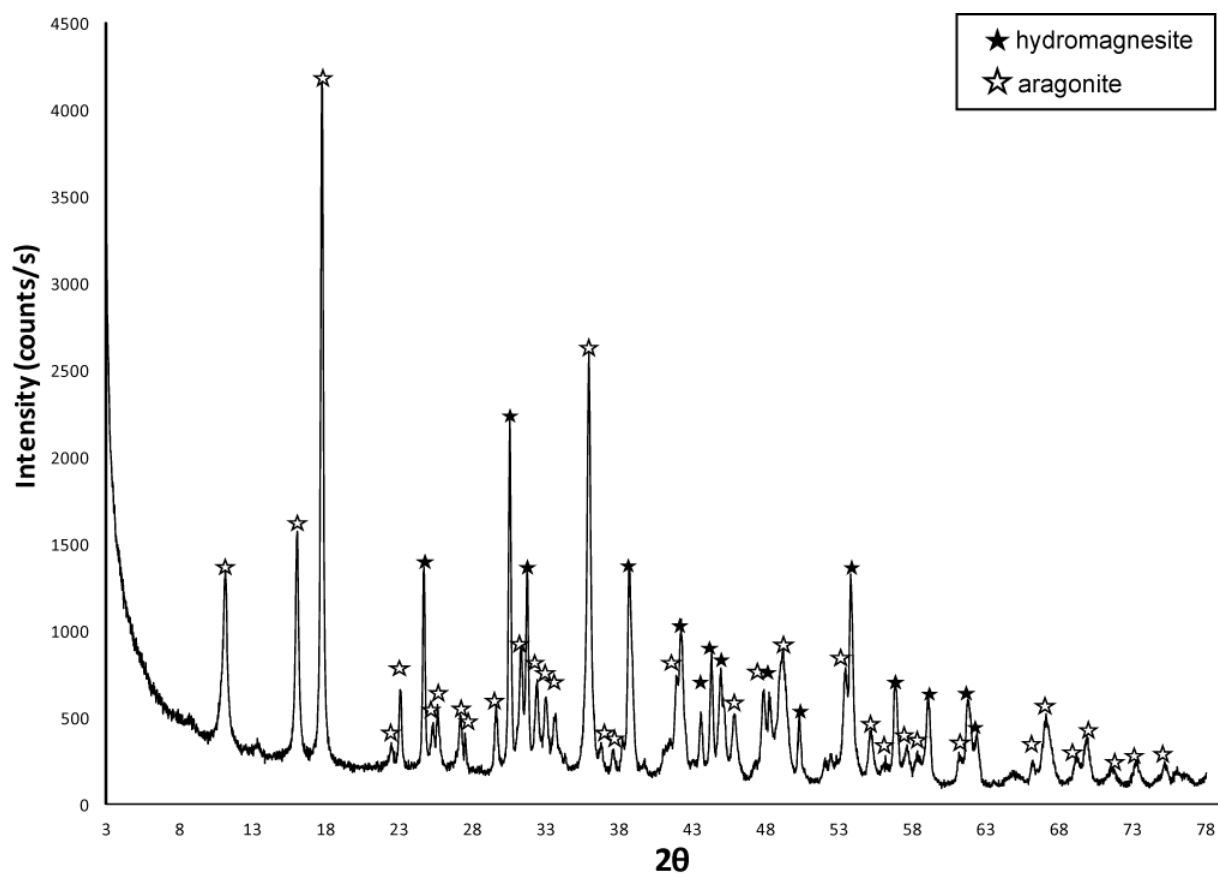




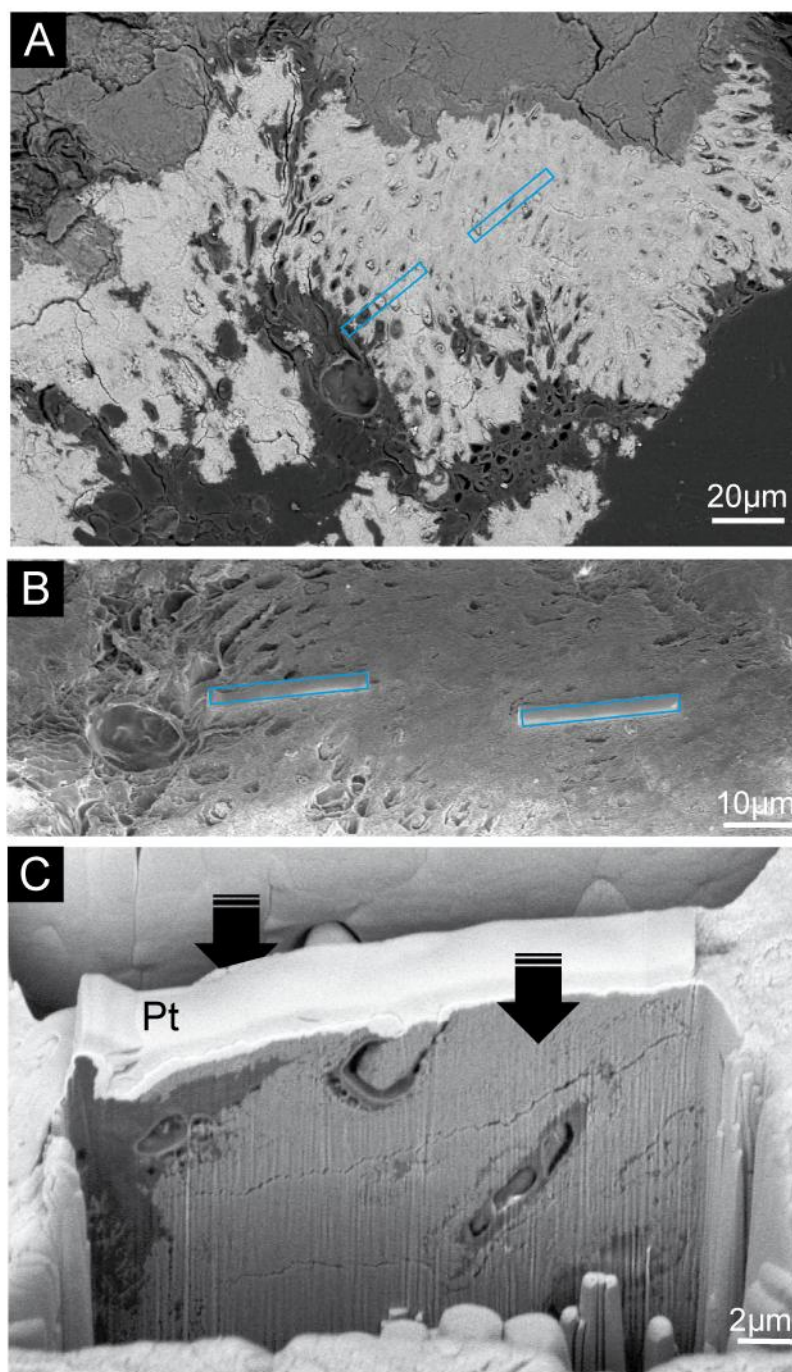
**Figure 4 :** TEM pictures of FIB section A and B cut across Pleurocapsales cells encrusted within aragonite. (A,D) Picture of the whole FIB section A and B respectively. Part filled by organic matter appeared smooth (green) while other area are filled with fibrous aragonite (aragonite type 1) except area surrounded by orange lines where crystals of aragonite are bigger (aragonite type 2). Lines of less resistance in the type 1 aragonite pattern are underline by green dotted lines. They delineate the limit in the pavement from one cell to the other. (B) Zoom picture of the panel B marked in (A) showing an encrusted cell. (C) Zoom picture of the panel C marked in (B) showing the radial implantation of aragonite needle on the surface of the cell. (E) Zoom picture of the panel E marked in (D) showing the textural organization of successive aragonite type 1 layers. (F) Zoom picture of the panel F marked in (D) showing the limit between aragonite type 1 and aragonite type 2, no organic matter remains associated to the inner part of the cell at this point.



**Figure 5 :** Hypothetical model of mineralization pattern of Pleurocapsales cells within aragonite. Each step is illustrating by a SEM picture and the corresponding scheme. The mineralization gradient is increasing from left to right. (1) Living colony of Pleurocapsales cells. (2) Needles of aragonite Type 1, nucleate and begin to grow from the surface of Pleurocapsales cells. (3) Growth of aragonite Type 1 outside the cells becomes continuous. The inner part is still organic and begins to be replacing by aragonite Type 2. (4) At the end the cell is totally filled by aragonite, an organic wall limiting aragonite Type 1 and Type 2 is preserved temporarily.

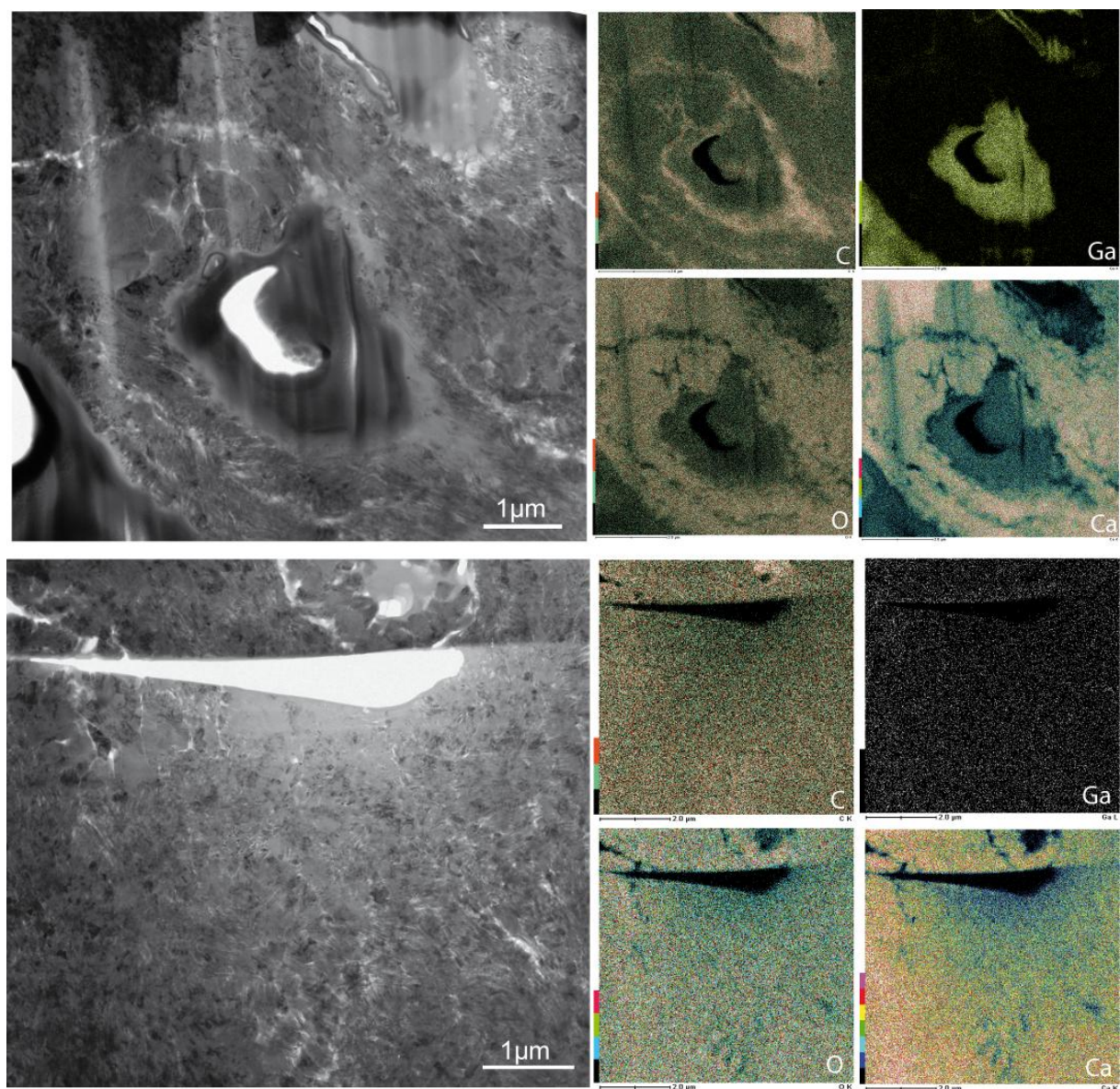


**Figure S1** : Powder DRX diffractogram of 4m microbialite sample. Peaks assigned to hydromagnesite are marked with a black star, peaks assigned to aragonite are marked with a white star



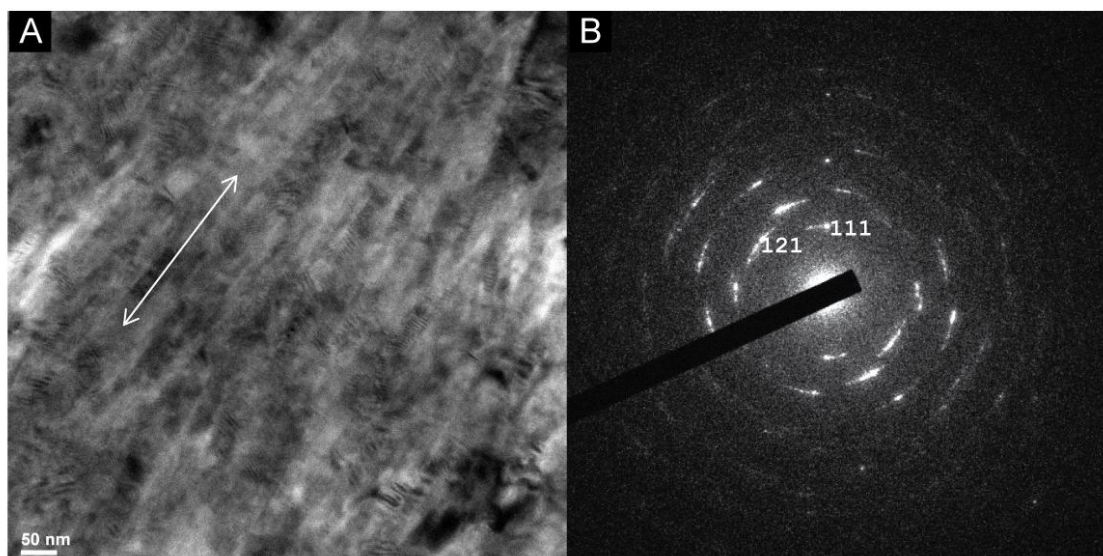
**Figure S2 :** FIB sections localization and sampling. (A) SEM picture (secondary electron mode) showing the localization of the FIB sections A and B. (B) SEM picture (In lens mode) showing the localization of platinum deposits corresponding to the area protected from the ion beam during the milling process (B) SEM picture (secondary electron mode) of the FIB section A during the milling process. The ion beam removes matter on both sides of the sample section (black arrows) which is protected by the platinum layer (Pt). Cut of Pleurocapsales cells are visible on this incipient section.



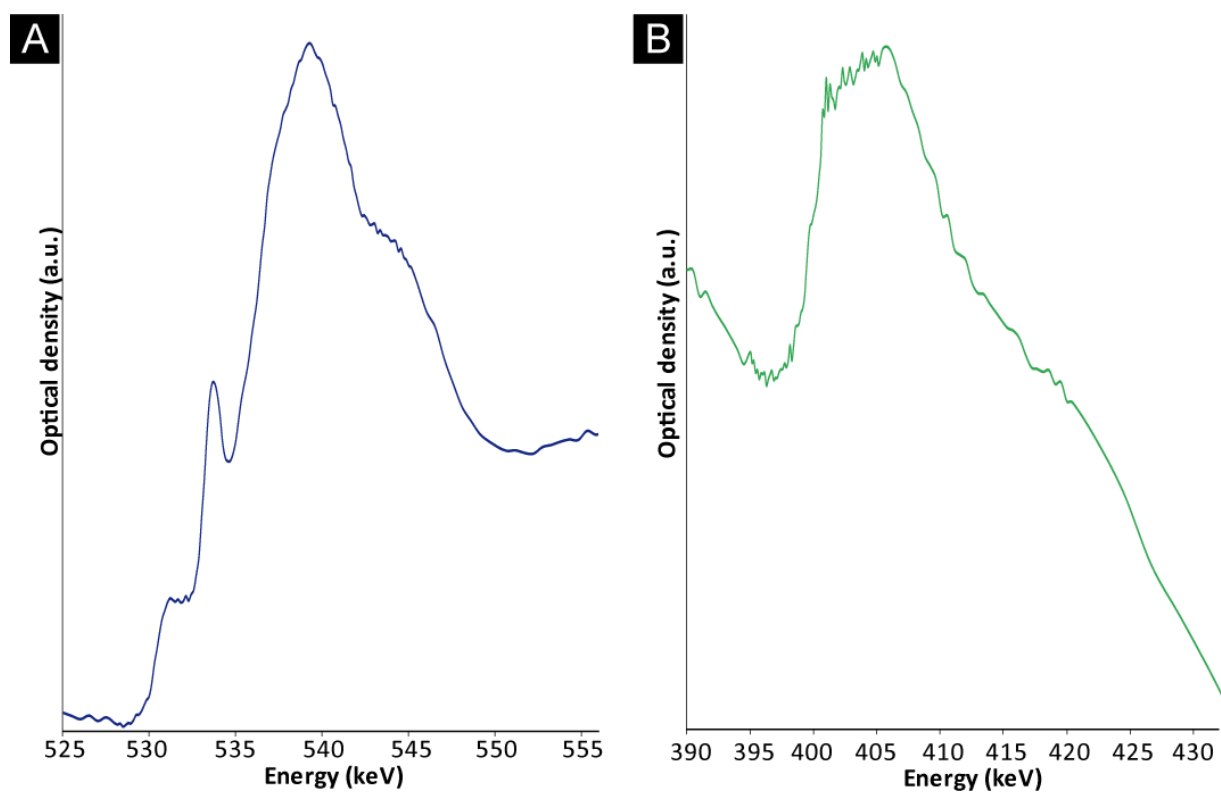


**Figure S3** : EDX analyses of FIB A and B sections. TEM picture of FIB A and B, and corresponding EDX elementary map (C carbon, Ga gallium, O oxygen and Ca calcium).





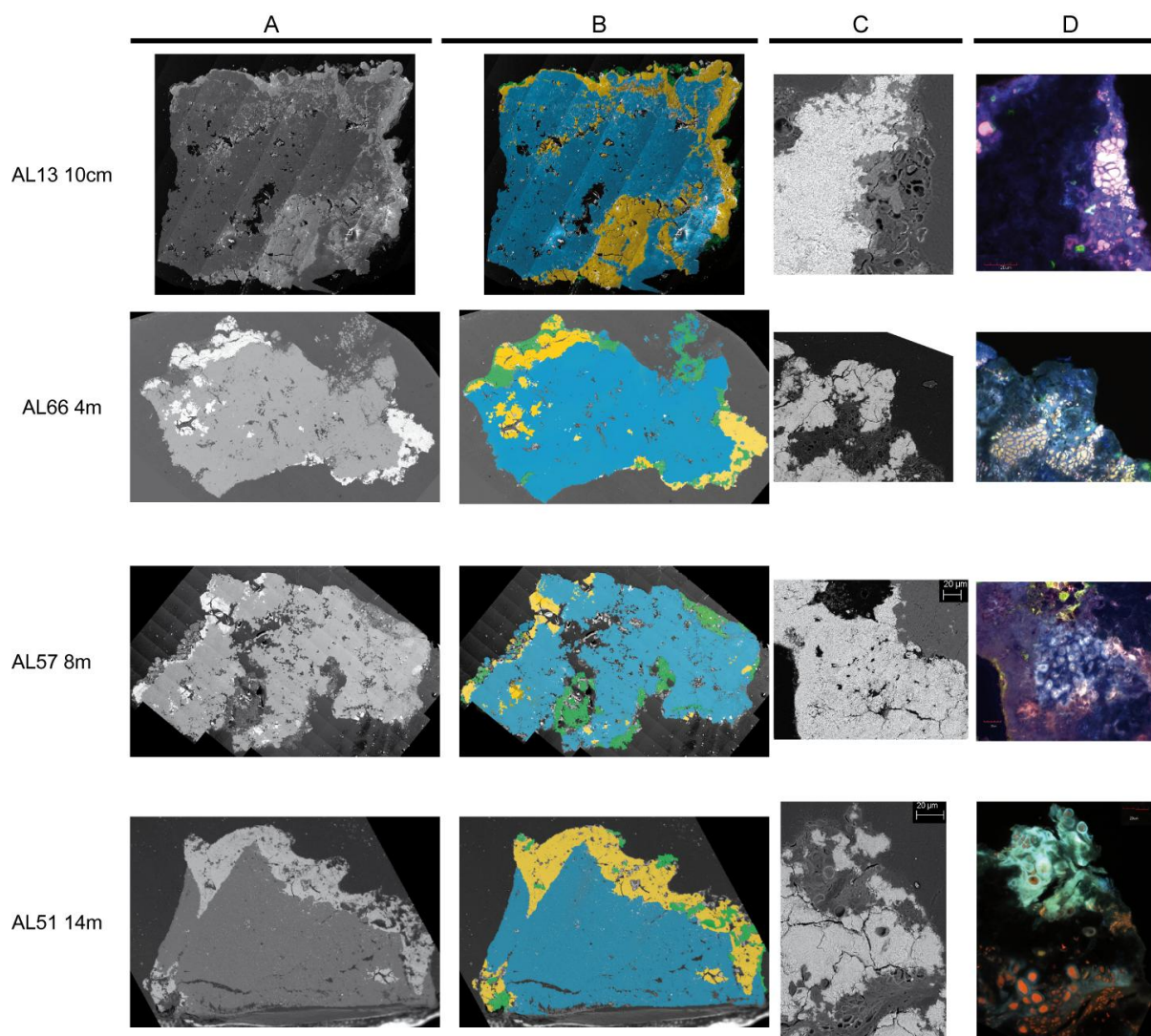
**Figure S4 :** Diffraction pattern of aragonite Type 1. (A) TEM picture of the area where the diffraction pattern was measured. A preferential orientation of aragonite Type 1 needles (white arrow) is visible. (B) Diffraction pattern showing arcs of restricted angular stretch suggesting the presence of well crystallized aragonite nanocrystals with a preferential crystallographic orientation.



**Figure S5 :** O k-edge (A) and N k-edge (B) NEXAFS spectra on remnant organic matter composing the cells.

### III. Données supplémentaires

#### A. Panorama des échantillons le long du gradient de profondeur d'échantillonnage dans le lac (0 m -14 m)



**Figure 12 :** Observation de coupes semi-fines d'échantillons provenant de différentes profondeurs du lac d'Alchichica (10 cm, 4 m, 8 m et 14 m) préalablement inclus dans la résine LR-white. La colonne A présente une vue générale de l'échantillon, observé en microscope électronique à balayage (mode In-lens pour AL13 et électrons secondaires pour les suivant). La colonne B présente les mêmes images que la colonne A traitées avec des fausses couleurs. Le vert correspond aux zones de biofilm, le bleu à l'hydromagnésite et le jaune à l'aragonite. Les colonnes C et D présentent un zoom sur une zone de l'échantillon observée au microscope électronique à balayage (C) et au microscope confocal (D) où l'association Pleurocapsales/aragonite est visible.

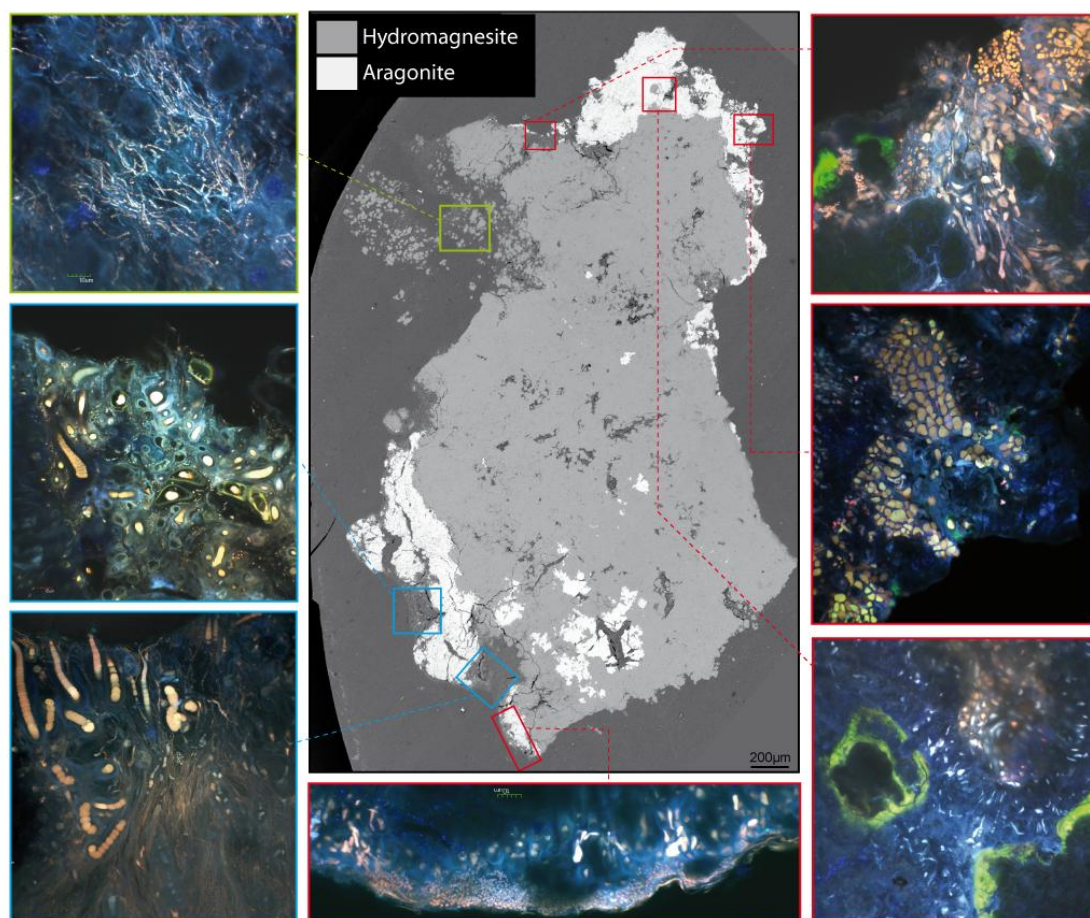
## CHAPITRE 2

Les observations complémentaires sur des échantillons de diverses profondeurs résumées dans la [figure 12](#) montrent que l'association entre les colonies de Pleurocapsales et l'aragonite est retrouvée de façon systématique. Cependant on note une certaine diversité de morphologie des colonies de cyanobactéries, de même elles pénètrent plus ou moins dans l'aragonite. On note dans le cas de l'échantillon AL57 que la zone sélectionnée ne présente pas de cellules vivantes (colonne C et D), cependant la texture de l'aragonite et la fluorescence résiduelle permettent à ce stade avancé de biominéralisation de reconnaître les colonies fossiles.

Même si cette approche demeure qualitative il semble que les cyanobactéries de l'ordre des Pleurocapsales jouent un rôle majeur dans la formation de l'aragonite et donc l'accrétion des microbialites. Il est à noter qu'aucune observation texturale à fine échelle ne nous permet de confirmer un remplacement diagénétique syngénétique de l'aragonite par l'hydromagnésite comme cela avait été proposé (*Kaźmierczak et al. 2011*). Le devenir de l'aragonite et des microfossiles associés dans les processus ultérieurs de diagénèse demeure une question ouverte.



## B. Les autres microorganismes photosynthétiques



**Figure 13 :** Observations d'une coupe semi-fine de l'échantillon AL66-4m préalablement inclus dans la résine LR-white. La zone centrale correspond à une image de l'ensemble de l'échantillon prise au microscope électronique à balayage (mode électrons secondaires). Le contraste est ici lié aux différences chimiques, en blanc l'aragonite et en gris clair l'hydromagnésite. Les images autour présentent des zooms sur différentes zones de biofilms prises au microscope confocal. La fluorescence observée est la fluorescence naturelle des microorganismes à laquelle s'ajoute le signal de la calcein (vert) et la réflexion des minéraux (bleu).

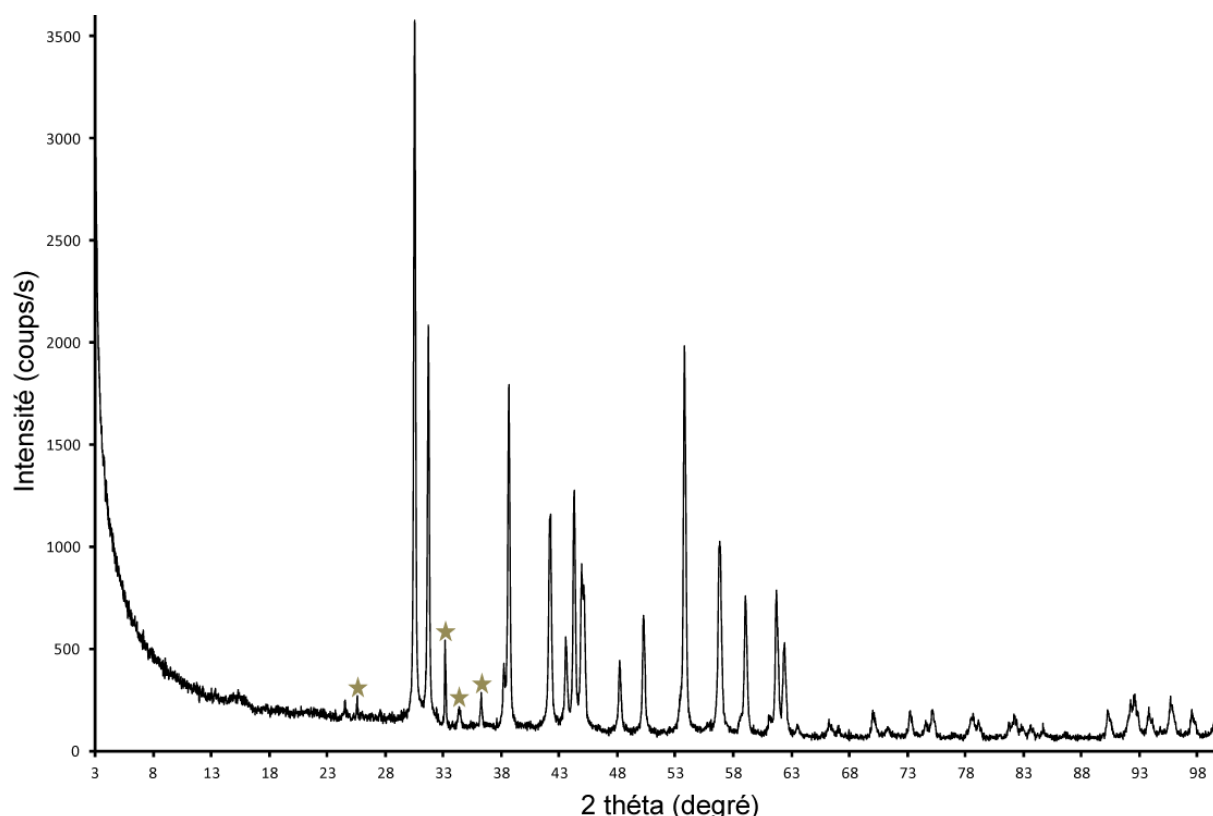
La **figure 13** illustre la diversité des microorganismes photosynthétiques qui ont pu être observés grâce au CLSM. Les zones encadrées en rouge sont des zones à Pleurocapsales. On voit que les colonies sont plus ou moins imbriquées dans l'aragonite et qu'elles présentent des aspects variables. Par exemple le cadre inférieur présente une zone dans laquelle des baeocytes sont formés abondamment à la surface alors que dans la zone en haut à droite on a un mélange entre des baeocytes (orange) et des cellules végétatives de plus grande taille. Les zones encadrées en bleu illustrent des endroits de biofilm épais qui colonise la surface minérale mais n'y est pas étroitement associé. Dans ces zones on trouve une grande diversité

de cyanobactéries (on reconnaît notamment des Nostocales et des Oscillatoriales) ainsi que des diatomées. Enfin la zone encadrée en vert présente une zone de l'échantillon dans laquelle des gros grains d'hydromagnésite sont associés à des cyanobactéries filamenteuses de type Oscillatoriales. Ce type d'observation a été fait à plusieurs reprises et nous conduit à proposer que l'hydromagnésite précipite dans la colonne d'eau à proximité du biofilm et est ensuite piégée par celui-ci grâce au réseau filamenteux formé par les Oscillatoriales. Si ce mécanisme de piégeage existe il ne serait pas sans rappeler celui qui a été observé dans le cas des stromatolites des Bahamas pour les particules sédimentaires (*Reid et al. 2000b*). La formation des microbialites d'Alchichica serait alors le résultat de deux processus : d'une part la précipitation *in situ* d'aragonite par les Pleurocapsales et d'autre part le piégeage et l'accrétion de l'hydromagnésite et de particules détritiques par des biofilms dominés par les Oscillatoriales.

### **C. Étude de l'échantillon subfossile AL10**

L'échantillon AL10 a été prélevé sur un microbialite subfossile émergé de couleur marron. Ce type de microbialite est minoritaire sur les bords du lac d'Alchichica en comparaison des microbialites blancs dominés par l'hydromagnésite. À part l'échantillon AL10, tous les autres échantillons présentés dans ce travail ont été prélevés sur des microbialites blancs.

L'analyse par diffraction des rayons X sur poudre de l'échantillon AL10 (**Figure 14**) révèle que celui-ci est composé d'aragonite. Une autre phase est également présente mais n'a pas pu être identifiée sur la base de l'analyse DRX pour l'instant. L'échantillon AL10 diffère donc de l'ensemble des autres échantillons par l'absence d'hydromagnésite.



**Figure 14** :: Diffractogramme de poudre réalisé sur l'échantillon de microbialites AL10. Les pics de diffractions présents sont tous attribués à l'aragonite à l'exception de ceux indiqués par une étoile qui n'ont pas pu être indexés.

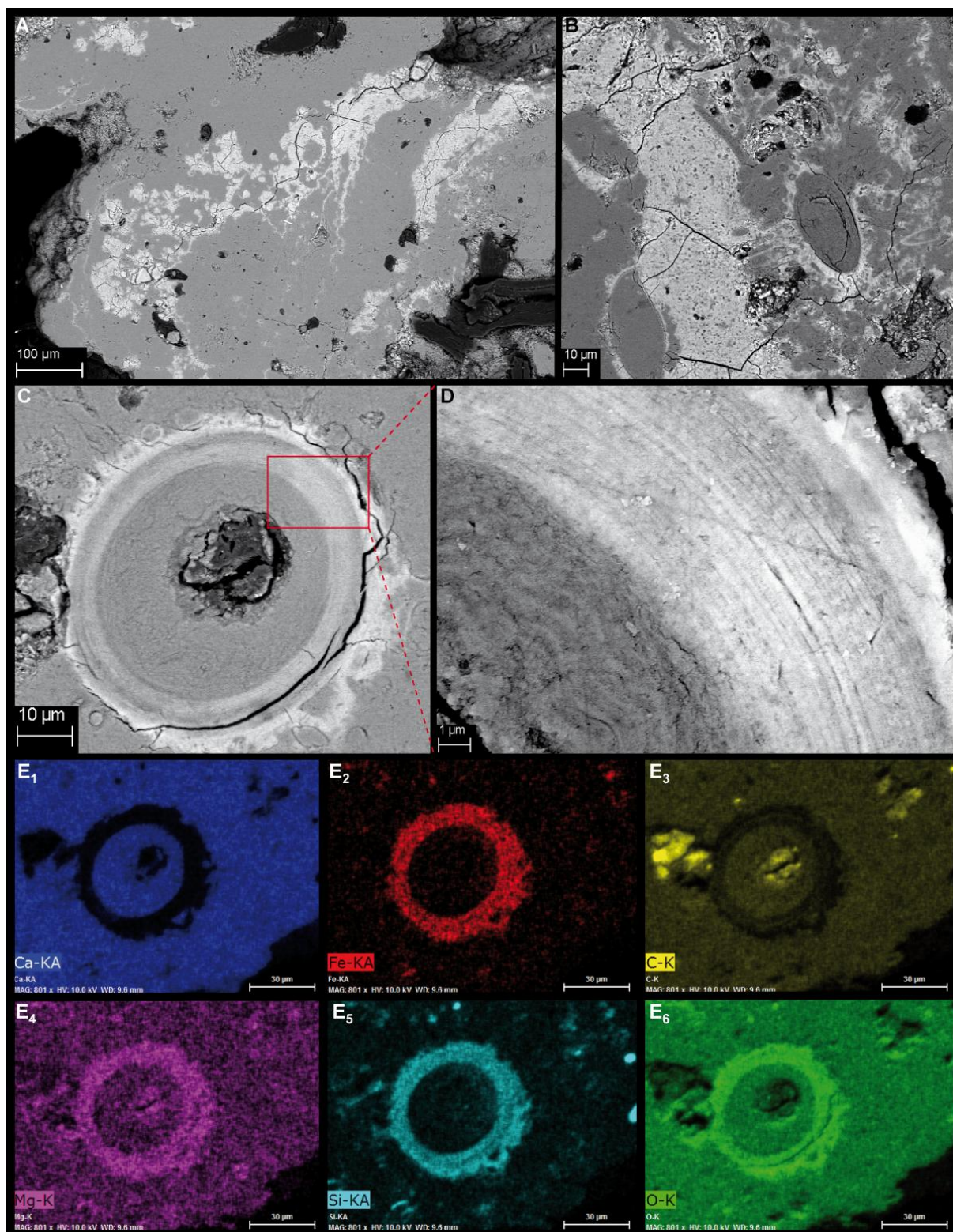
L'imagerie SEM sur la surface polie de l'échantillon AL10 montre qu'il existe bien deux phases minérales (Figure 14). L'aragonite est la phase majoritaire, la seconde phase qui est porteuse de silicium, de fer et de magnésium est distribuée sous forme de lamines ou de marbrures dans l'aragonite. Cette seconde phase est donc un silicate de fer et de magnésium. Par ailleurs nous avons observé sur la surface polie de nombreux microfossiles circulaires de taille variable dont les contours sont soulignés par la présence du silicate Fe-Mg (Figure 15).

Comme dans l'étude précédente, des microfossiles ont été préservés dans l'aragonite. Cependant ici il semble que la mise en place de la seconde phase type silicate de Fe-Mg soit systématique dans le processus de fossilisation. La nature exacte du rôle de cette phase dans la préservation de l'intégrité des microfossiles lors de la diagenèse restera à préciser. De plus ici des microfossiles de toutes tailles ont été observés, en particulier des microfossiles sphériques de 50-60  $\mu\text{m}$  de diamètre (Figure 15C), qui ne ressemblent pas aux plages quasi mono-spécifiques de Pleurocapsales décrites auparavant dans les microbialites blancs et qui pourraient correspondre ici à des eucaryotes.



## CHAPITRE 2

Il est à noter que la phase silicatée présente dans l'échantillon AL10 est différente de celle mise en place dans les autres microbialites d'Alchichica (Chapitre 1, I, B) puisqu'elle ne contient pas d'aluminium.

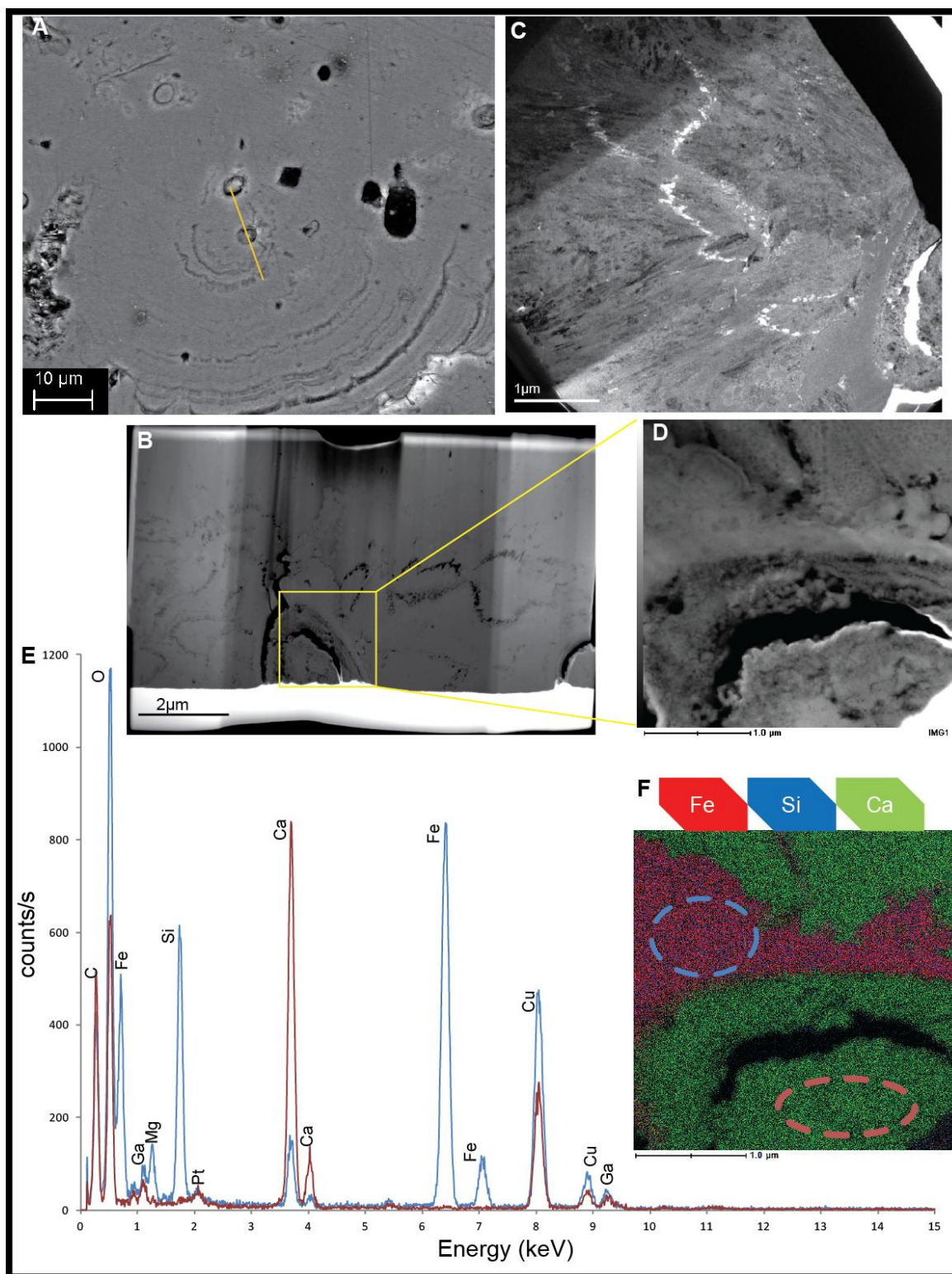


**Figure 15 :** (A-D) Images SEM (mode AsB) de la surface polie de l'échantillon AL10. La phase majoritaire porteuse de calcium est l'aragonite, elle apparaît gris-clair. On note qu'il existe une seconde phase (blanche). Elle forme des marbrures et entoure des microfossiles (B et C). Le microfossile présenté en C présente une paroi où plusieurs strates sont visibles (D). L'analyse EDX du microfossile C présenté en E1-E6 révèle que la phase qui entoure le microfossile est riche en fer, silicium et magnésium. Le centre du microfossile est relativement enrichi en carbone.

## CHAPITRE 2

Pour aller plus loin dans la caractérisation de ces microfossiles et des phases minérales associées, des lames FIB ont été préparées dans l'échantillon AL10. La lame g1 (Figure 16) a été préparée dans un microfossile putatif de taille micrométrique. L'analyse de cette lame montre qu'elle est constituée essentiellement d'aragonite présentant une texture fibreuse. Le microfossile putatif au centre de la lame est lui aussi rempli d'aragonite mais il est bordé par une phase qui apparaît peu ou pas cristalline au TEM, qui est le silicate de Fe-Mg. Cette phase a également été retrouvée au niveau des marbrures que l'on voit de part et d'autre du microfossile en STEM (Figure 16 B) et qui correspondent sans doute aux anneaux concentriques autour du microfossile sur l'image A (Figure 16). L'alternance de minéraux carbonatés et de silicate formant des lamines à micro-échelle a déjà été observée dans d'autres exemples de microbialites modernes (*Sanchez-Navas et al. 1998; Leveille et al. 2000; Leveille et al. 2002; Benzerara et al. 2010*).



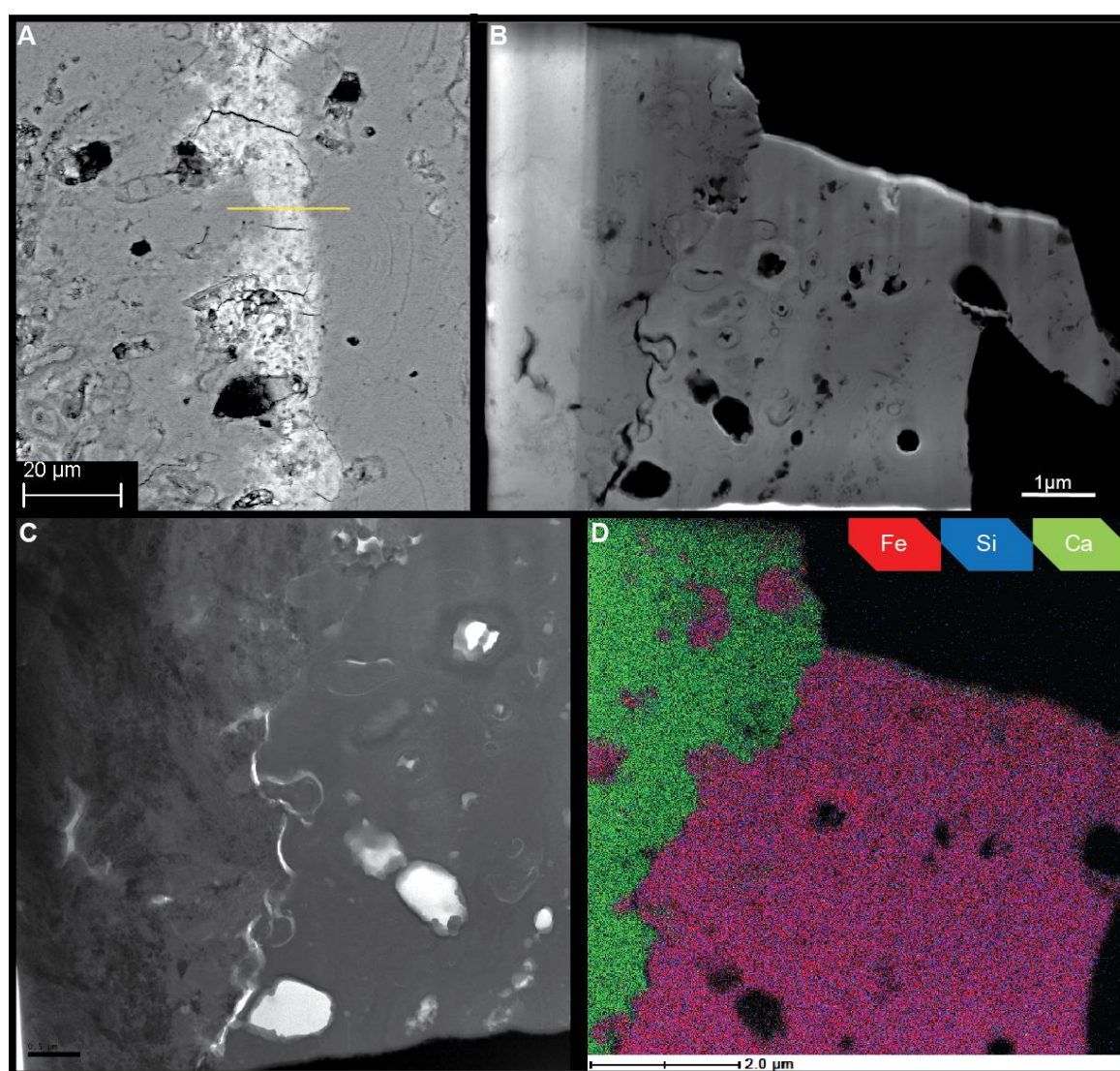


**Figure 16 :** Etude de la lame FIB g1. (A) Localisation du trait de coupe sur une image SEM de la surface polie d'AL10 à travers deux microfossiles putatifs. (B) Image de la lame FIB entière (TEM mode STEM) (C) Image d'une portion de la lame FIB (mode TEM) qui montre une différence de texture l'ensemble de la lame constituée de nano-baguettes d'aragonite en faisceau et le tour du microfossil qui est très lisse. (D) Zoom sur la partie de la lame FIB portant le microfossil analysé en EDX (E). Les pics de Cu, Ga et Pt sont des artefacts introduits par les différentes étapes de

## CHAPITRE 2

préparation de l'échantillon. (F) Cartographie EDX des éléments Fe, Si et Ca sur la zone du microfossile. On voit que l'intérieur de celui-ci est en aragonite et qu'il est limité par le silicate de fer. Les zones d'acquisition des spectres sont matérialisées par les cercles en pointillés.

Une seconde lame FIB (a1) a été préparée dans une lamine de 10 $\mu$ m de largeur de silicate de Fe-Mg (Figure 17). L'étude de cette lame FIB révèle encore une fois qu'il existe une différence nette de texture entre l'aragonite fibreuse organisée en nano-baguettes et le silicate de Fe-Mg peu ou pas cristallisé. Par ailleurs on note que la lamine de silicate de Fe-Mg présente un grand nombre de microfossiles putatifs de tailles et de formes très variables. Certains d'entre eux semblent présenter une gaine, d'autres semblent être filamenteux.



**Figure 17 :** Etude de la lame FIB a1. (A) Localisation du trait de coupe de la lame FIB à travers une lamine de silicate de fer sur la surface polie d'AL10 (mode AsB). (B) Image de la lame FIB qui a été prélevée partiellement. On note une grande concentration de microfossiles dans le silicate de fer (Image TEM mode STEM). (C) Image TEM d'une partie de la lame FIB montrant l'interface entre (D) Cartographie EDX des éléments Fe, Si et Ca sur la zone du microfossile. On voit que l'intérieur de celui-ci est en aragonite et qu'il est limité par le silicate de fer. Les zones d'acquisition des spectres sont matérialisées par les cercles en pointillés.

## CHAPITRE 2

l'aragonite à gauche avec une texture en baguette très fine et le silicate de fer à droite. (D) Cartographie élémentaire du Fe, Si et Ca superposés d'une partie de la lame FIB. On voit que le calcium marque l'aragonite alors que Si et Fe sont distribués au niveau du silicate de fer.

L'étude de l'échantillon AL10 présente un exemple de fossilisation des micro-organismes associés aux biofilms d'Alchichica très différent de ce qui a été vu précédemment dans le cas des Pleurocapsales. Il a été proposé que les biofilms microbiens piégeant les ions (e.g.  $\text{PO}_4^{3-}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{CO}_3^{2-}$ , Fe, Al, Si) au niveau des exopolymères pourraient former une matrice qui en se déshydratant donnerait un gel, précurseur de la cristallisation de la phase silicatée (Leveille *et al.* 2000). Ce mécanisme permettrait d'expliquer pourquoi la phase silicatée est plus ou moins amorphe au sein d'un même échantillon (Sanchez-Navas *et al.* 1998). De plus si ce mécanisme existe il pourrait également permettre d'expliquer qu'une grande diversité de microorganismes présentant des morphologies variables ait pu être préservée. En effet la mise en place d'un gel qui minéraliserait secondairement pourrait préserver une image instantanée du biofilm avec toute sa diversité. De plus le fait que la phase qui se forme soit partiellement amorphe pourrait également permettre d'expliquer le bon état de préservation, en effet la croissance de cristaux aurait pu altérer la morphologie des microorganismes. Ce mécanisme serait alors très différent de celui présenté pour la fossilisation des Pleurocapsales, car dans ce cas là, les autres microorganismes ne sont pas préservés.

Des données STXM au seuil K du carbone ont été acquises sur les lames a1 et g1. Le traitement préliminaire de ces données montre que les zones constituées du silicate de fer présentent des bandes de faible intensité à 285eV, 288.4eV et 290.2eV que l'on peut attribuer respectivement aux groupements aromatiques, carboxyliques et carbonates (Benzerara *et al.* 2004; Benzerara *et al.* 2006). Une analyse plus fine de ces données sera nécessaire pour mieux caractériser la distribution des groupements organiques. Des études complémentaires par spectroscopie XANES seront également à mener sur les lames FIB aux seuils d'autres éléments tels que le calcium et le fer pour mieux caractériser la phase silicatée. L'étude de cet échantillon est très prometteuse dans le cadre de la recherche de microfossiles dans les roches anciennes. En effet le cas de l'échantillon AL10 montre qu'il est *a priori* possible de préserver une grande quantité de microorganismes différents et donc potentiellement de mieux contraindre la diversité microbienne présente au moment de la formation du microbialite.





## CHAPITRE 3

### Précipitation intracellulaire de carbonates par les cyanobactéries

« - S'il te plaît... apprivoise-moi ! dit-il.

- Je veux bien, répondit le petit prince, mais je n'ai pas beaucoup de temps. J'ai des amis à découvrir et beaucoup de choses à connaître.

- On ne connaît que les choses que l'on apprivoise, dit le renard. [...]

- Que faut-il faire? dit le petit prince.

- Il faut être très patient, répondit le renard. Tu t'assoiras d'abord un peu loin de moi, comme ça, dans l'herbe. Je te regarderai du coin de l'œil et tu ne diras rien. Le langage est source de malentendus. Mais, chaque jour, tu pourras t'asseoir un peu plus près... »

*Antoine de Saint-Exupéry, Le petit prince, 1943*

## I. Résumé de l'article n°3

### « Une cyanobactérie basale qui forme des carbonates intracellulaires »

#### A. Contexte & Objectifs

Il existe très peu de cas connus de biominéralisation intracellulaire chez les procaryotes. Un cas a cependant été très bien décrit, c'est celui de la production de magnétite  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  et/ou de greigite  $\text{Fe}_3\text{S}_4$  par les bactéries magnétotactiques (*Edwards et al. 2008; Lefevre et al. 2011*). Ces bactéries sont capables de former des minéraux de façon contrôlée (*Jogler et al. 2009*) dans des compartiments cellulaires limités par une membrane, les magnétosomes. La présence de magnétosomes a été détectée chez quelques membres des alpha-, gamma- et deltaprotéobactéries ainsi que des Nitrospirae (*Bazylinski et al. 2004*). En revanche, rien n'était jusqu'alors connu sur la possibilité de biominéralisation intracellulaire chez les cyanobactéries.

Cette partie, de même que le chapitre précédent s'inscrit dans le cadre de la description des relations qui existent entre les cyanobactéries et les minéraux carbonatés au sein des microbialites d'Alchichica. Il rapporte la découverte d'un cas de biominéralisation intracellulaire ainsi que les premiers éléments de sa description.

La démarche ici a été d'une part de décrire la biominéralisation intracellulaire dans les échantillons de l'aquarium grâce à la microscopie optique, confocale et électronique et à la spectroscopie XANES et d'autre part de mettre en culture les souches capables de réaliser la biominéralisation intracellulaire afin de déterminer leur affiliation phylogénétique et de mieux les caractériser.

#### B. Principaux résultats & Éléments de discussion

Cette étude décrit la souche *Candidatus Gloeomargarita lithophora* enrichie à partir des échantillons de biofilm associés aux microbialites d'Alchichica. Cette souche est la première souche de cyanobactéries décrite capable de produire des minéraux de façon intracellulaire.

### CHAPITRE 3

Ces minéraux sont des carbonates amorphes de Ca, Sr, Ba, Mg qui représentent 6% du volume de la cellule en moyenne. Ils se présentent dans la cellule sous forme de perles ayant un diamètre moyen de 270 nm.

*Candidatus* Gloeomargarita lithophora est un membre de l'ordre des Gloeobacterales, qui est un ordre basal dans l'arbre phylogénétique des cyanobactéries, branchant avant la divergence des chloroplastes.

Le mécanisme de formation de ces inclusions demeure inconnu. Cependant il est clair que la précipitation d'un carbonate de Ca, Ba, Sr et Mg à l'intérieur de la cellule nécessite que la solution intracellulaire soit sursaturée vis-à-vis de cette phase. Ceci implique au moins que le Ba et le Sr soient sélectivement concentrés par la cellule. Le processus de biominéralisation est donc contrôlé par la cellule, le niveau de contrôle et les mécanismes moléculaires restent à déterminer.

La position phylogénétique basale de la souche suggère que la biominéralisation intracellulaire pourrait être un caractère ancestral dans la lignée des cyanobactéries qui aurait ensuite été remplacé par la biominéralisation extracellulaire ou qui aurait été perdu. Si cette hypothèse était exacte, le fait que les cyanobactéries soient incapables de biominéralisation extracellulaire au début de leur histoire évolutive pourrait fournir une explication alternative à l'absence de calcimicrobes (microfossiles de cyanobactéries) à l'Archéen (Introduction I-B-3). En effet il est probable que la biominéralisation intracellulaire à l'inverse de la biominéralisation extracellulaire ne favorise pas la préservation de la cellule sous forme de microfossile.

Les conséquences de la biominéralisation intracellulaire sur la division des cellules, leur flottabilité et leur activité métabolique restent à évaluer.

## II. Manuscrit de l'article n°3

**“An early-branching microbialite cyanobacterium forms  
intracellular carbonates”**

*(science report, under review)*

2  
3  
4 **An early-branching microbialite cyanobacterium forms intracellular**  
5 **carbonates**  
6

7 **Estelle Couradeau<sup>1,2,3</sup>, Karim Benzerara<sup>1</sup>, Emmanuelle Gérard<sup>2</sup>, David Moreira<sup>3</sup>,**  
8 **Sylvain Bernard<sup>4</sup>, Gordon E. Brown Jr.<sup>5,6</sup>, and Purificación López-García<sup>3</sup>**  
9

10 <sup>1</sup>Institut de Minéralogie et de Physique de la Matière Condensée, CNRS UMR 7590,  
11 Université Pierre et Marie Curie, 75005 Paris, France; <sup>2</sup>Institut de Physique du Globe de Paris,  
12 CNRS UMR 7154, Université Paris Diderot, 75005 Paris, France ; <sup>3</sup>Unité d'Ecologie,  
13 Systématique et Evolution, CNRS UMR 8079, Université Paris-Sud, 91405 Orsay Cedex,  
14 France; <sup>4</sup>Laboratoire de Minéralogie et de Cosmochimie du Museum (LMCM - MNHN),  
15 CNRS UMR 7202, 57 rue Cuvier 75231 Paris Cedex 5, France.; <sup>5</sup>Surface and Aqueous  
16 Geochemistry Group, Department of Geological and Environmental Sciences, Stanford  
17 University, Stanford, CA 94305-2115, USA, <sup>6</sup> Department of Photon Science and Stanford  
18 Synchrotron Radiation Lightsource, SLAC National Accelerator Laboratory, 2575 Sand Hill  
19 Road, Menlo Park, CA 94025, USA  
20  
21  
22  
23  
24

25 Correspondence: K.B., karim.benzerara@impmc.upmc.fr  
26

## Abstract

Cyanobacteria have impacted major geochemical cycles (C, N & O) on the Earth for billions of years. They have been looked for in the geological record in the form of fossil encrusted cells based on the assumption that cyanobacterial calcification is always an extracellular process. Here we report the discovery of a cyanobacterium in microbialites that forms intracellular Ca-Mg-Sr-Ba carbonate inclusions, revealing an unexplored pathway for calcification. Phylogenetic analyses place this cyanobacterium within the deeply divergent order Gloeobacterales. Accordingly, we tentatively name it *Candidatus Gloeomargarita lithophora*. This discovery opens the possibility that ancestral calcifying cyanobacteria may have biomineralized carbonates intracellularly, thus not being prone to encrustation in extracellular precipitates. This provides an alternative explanation to the absence of cyanobacterial microfossils in the oldest fossil stromatolites.

Cyanobacteria comprise a phylogenetically diverse group of bacteria that can carry out oxygenic photosynthesis (1). These cosmopolitan microorganisms occupy a wide array of terrestrial, marine and freshwater habitats. They are major modern primary producers, as exemplified by the two marine cyanobacterial genera *Prochlorococcus* and *Synechococcus*, responsible of 25% of global photosynthesis (2). In addition to their evolutionary importance as ancestors of chloroplasts in photosynthetic eukaryotes (1), cyanobacteria have an extensive fossil record. Calcified cyanobacteria are commonly found since the base of the Cambrian, the earliest undisputed occurrence being *Girvanella* at 700 Ma (3). Moreover, it has been proposed that the occurrence of massive fossil stromatolites trace back their emergence to at least 2.7 Ga (4). Since then, they have played a major role in the carbon cycle by converting CO<sub>2</sub> into organic carbon and carbonates (2) and incidentally enriching the atmosphere in oxygen (5).

It is commonly accepted that carbonate precipitation by some cyanobacteria results from their photosynthetic activity (6, 7). Photosynthesis locally increases the concentration of  $\text{CO}_3^{2-}$  through the disproportionation of bicarbonate to carbonate and  $\text{CO}_2$ , which is fixed by ribulose-1,5-diphosphate carboxylase (RuBisCO). The export of alkalinity from the intracellular to the extracellular medium involves a mechanism that is still poorly documented. This raises the saturation index of the surrounding micro-environment for carbonate minerals, leading to mineral precipitation if free cations (e.g.,  $\text{Ca}^{2+}$ ) and nucleation sites are available (6). In all cases described so far (e.g., (2, 8)), carbonate mineral precipitation by cyanobacteria is extracellular. As a result, the chemical composition of precipitates depends essentially on surrounding environmental conditions, with little control by the cell (9). Calcification efficiency varies among different species as a function of extracellular surface properties, including exopolymer composition (10) or varying physiological states of the cell (11, 12). However, cyanobacterial calcification has been studied only in a few model species and, thus, current knowledge of involved mechanisms remains limited to a narrow phylogenetic window.

Here, we studied biofilms dominated by cyanobacteria derived from modern microbialites collected in the highly alkaline (pH~8.9) Lake Alchichica (Mexico) (13, 14). These microbialites are mostly composed of hydromagnesite ( $\text{Mg}_5(\text{CO}_3)_4(\text{OH})_2 \cdot 4(\text{H}_2\text{O})$ ) and aragonite ( $\text{CaCO}_3$ ). In the course of long-term studies of Alchichica microbialites maintained in laboratory aquaria, we observed the conspicuous development of phototrophic biofilms on aquarium walls (Fig. S1). These biofilms were observed by a combination of conventional light microscopy, confocal laser scanning microscopy (CLSM), and scanning electron microscopy (SEM). The biofilms were dominated by cyanobacteria of different sizes and morphotypes (15), also recognizable by CLSM based on their red autofluorescence (using a green excitation wavelength). Among these different morphotypes, one relatively small, rod-



shaped, unicellular morphotype was particularly abundant (Fig. S1). These cells measured  $3.9 \pm 0.6 \mu\text{m}$  in length and  $1.1 \pm 0.1 \mu\text{m}$  in width and exhibited a granular cytoplasm (Fig. 1, A and B, table S1). Autofluorescence emission spectra measured on individual cells showed the presence of chlorophyll and phycocyanin, supporting their identification as cyanobacteria (Fig. S2). The same cells observed by CLSM and conventional light microscopy were re-imaged by SEM (Fig. 1, G-I). The intracellular granules systematically observed in this morphotype by light microscopy appeared as spherical inclusions by SEM (Fig. 1, C-F). The average number of inclusions per cell was  $21 \pm 5$ . Their average diameter was  $270 \pm 44 \text{ nm}$  (table S1). Moreover, these inclusions were very bright in backscattered electron (BSE) and secondary electron (SE) modes, suggesting that they contained high atomic number elements. Their chemical composition was determined using energy-dispersive X-ray spectroscopy (EDXS, Fig. 2A). Inclusions contained Ca, Mg, Ba and Sr as major elements with atomic ratios  $\text{Ca/Mg}=2.88$ ,  $\text{Ba/Mg}=1.11$  and  $\text{Sr/Mg}=0.42$  (table S2). Interestingly, these ratios differed significantly from those measured in the solution. Ba/Ca and Sr/Ca atomic ratios were, respectively, 1,370 and 86 times higher in the inclusions than in the medium where cells grew (table S2 and S3).

The structure of the Ca-Mg-Sr-Ba inclusions was further studied by transmission electron microscopy (TEM) and STXM. This technique allows imaging and acquisition of x-ray absorption near-edge structure (XANES) spectra at high spectral ( $\sim 0.1 \text{ eV}$ ) and spatial ( $\sim 25 \text{ nm}$ ) resolution. XANES spectra measured at the C-K edge on intracellular inclusions showed that they were carbonates based on the presence of a peak at  $290.3 \text{ eV}$  (Fig. 2C and table S4), which was attributed unambiguously to  $1s-\pi^*$  electronic transitions in carbonate groups(16). Selected area-electron diffraction patterns obtained on these inclusions suggested that they were amorphous (Fig. 2B). XANES spectra at the Ca  $L_{2,3}$  edges are indicative of the local structure around Ca and can be used to characterize poorly organized phases (e.g., 16,

17). Spectra measured on intracellular inclusions were significantly different from spectra of common reference Ca-carbonates such as aragonite, calcite, or Ca-substituted strontianite, but they were very similar to that of benstonite, a Mg-Ca-Sr-Ba carbonate (Fig. 2D and table S5). The stoichiometric formula of the intracellular inclusions can thus be written as  $(\text{Sr}_1\text{Ba}_{2.7}\text{Mg}_{1.4}\text{Ca}_{0.9})\text{Ca}_6\text{Mg}(\text{CO}_3)_{13}$  following that of benstonite and in agreement with EDXS analyses. Hence, intracellular inclusions might be composed of an unusual benstonite-like phase with no long-range order and an unusual stoichiometry. In total, inclusions occupied ca. 6% of the total cell volume raising the total density of the cells by 12% (table S6 and S7).

We enriched these cyanobacteria in culture by inoculating modified BG11 medium with cells smaller than 3  $\mu\text{m}$  from disrupted biofilms. CLSM and SEM observations showed that 6 enrichment cultures out of 96 contained this single cyanobacterial morphotype with intracellular inclusions, i.e. with no additional cyanobacterial morphotype as detected by microscopy (Fig. S3). This was further confirmed by amplification and sequencing of 16S rRNA genes using cyanobacterial-specific primers, which provided 100% identical sequences within and among the 6 enrichments. Phylogenetic analysis showed that this strain was a member of the basal cyanobacterial order Gloeobacterales (Fig. 3). Interestingly, these sequences were almost identical (99.7% sequence identity) to AQ1\_1\_1C\_35 (CyanoOTU02), an environmental sequence abundantly retrieved from aquarium microbialites (up to 20% of cyanobacterial sequences) (14). This indicates that this lineage is an important cyanobacterial component of actively growing microbialites, being able to disperse and form neighboring biofilms on aquarium walls. Because it is phylogenetically very distant from *Gloeobacter*, the only genus described within Gloeobacterales, we propose the following new candidate status:

Gloeobacterales order,

*'Gloeomargarita lithophora'* gen. et sp. nov.

126 **Etymology.** *gloeo* (Latin masculine adjective): glutinous ; *margarita* (Latin feminine name):  
127 pearl ; *lithophora* (Latin feminine adjective): bearing stones. The name alludes to the order  
128 name and benthic mode of the organism, in addition to its ability to form intracellular  
129 carbonate spherical inclusions.

130 **Locality.** Alchichica microbialites (Mexico) growing in aquaria (Orsay, France).

131 **Diagnosis.** A cyanobacterium possessing chlorophyll a and phycocyanin pigments, appearing  
132 as rods with a diameter of 1.1  $\mu\text{m}$  and a length of 3.9  $\mu\text{m}$  on average, and able to form  
133 intracellular Sr-Ba-Mg-Ca carbonate inclusions

134 The discovery of an early-branching cyanobacterium enriched from microbialites that  
135 forms carbonates intracellularly raises new questions with important implications for  
136 biomineralization processes, paleoenvironmental geochemistry and cyanobacterial  
137 physiology, ecology and evolution.

138 First, the geochemically important process of carbonate precipitation by cyanobacteria  
139 has traditionally been considered as extracellular (3, 7). Here, we show that a cyanobacterial  
140 species forms poorly crystalline Ca-Mg-Sr-Ba carbonates intracellularly. In addition, the  
141 chemical composition of the carbonate precipitates is significantly different from those  
142 formed extracellularly in the same solution. Incorporation of Sr and Ba in carbonates has been  
143 thoroughly investigated in the past since Sr/Ca and Ba/Ca ratios in marine carbonates are  
144 frequently used as paleoenvironmental proxies (18). Such proxies rely on the assumption that  
145 these ratios are approximately the same (or slightly lower) in the solid phases as in the  
146 solution. In *Ca. G. lithophora* intracellular inclusions, these ratios are much higher in the solid  
147 phase, similarly to what has been found in some algae (19) . Such an enrichment in Sr and Ba  
148 might involve active import systems specific for  $\text{Sr}^{2+}$  and  $\text{Ba}^{2+}$  and/or export systems  
149 extruding specifically  $\text{Ca}^{2+}$  and maintaining low cytoplasmic  $\text{Ca}^{2+}$  levels (20). Moreover, the

amorphous intracellular bioprecipitates are structurally and chemically different from the well-crystallized phases forming in the extracellular solution (i.e., aragonite and hydromagnesite). Amorphous calcium carbonates (ACC), which are very unstable phases, have been repeatedly found in biological, especially eukaryotic, systems (21). Consistent with what has often been observed in these systems (21), the presence of organic macromolecules may stabilize the intracellular amorphous carbonates observed in *Ca. G. lithophora*. Interestingly, diverse local structures have been recently suggested for these phases lacking long-range order (22). The present study expands the diversity of chemical compositions for ACC with the occurrence of a Mg-, Ca-, Sr-, Ba-containing phase.

Intracellular carbonate precipitation in this cyanobacterium likely influences its biology and ecology. First, by changing average cell density, these precipitates must significantly alter cell buoyancy. *Ca. G. lithophora* is abundant in cultured Alchichica microbialites. Consequently, its conspicuous occurrence in aquarium wall biofilms implies that a dispersive planktonic phase exists which allows the colonization of surrounding surfaces. Therefore, whereas gas vesicles function as flotation devices in planktonic cyanobacteria and other prokaryotes (23), it is tempting to speculate that intracellular carbonates might serve as ballasts being, in contrast, an adaptation to a benthic mode of life. Second, the formation of intracellular carbonates implies that the alkalinity excess produced by cyanobacteria during photosynthetic carbon fixation, a process taking place in carboxysomes, is not exported extracellularly, but trapped within amorphous carbonate inclusions. Whether carboxysomes could also provide nucleation centers for carbonate precipitation remains an open question. Carbonate precipitation could act as a pH buffering system leading to an efficient carbon concentrating mechanism and, hence, a high photosynthesis rate (3). The extent to which such intracellular carbonate precipitation may bypass other mechanisms regulating the cytoplasmic pH remains to be evaluated.

Finally, the discovery that intracellular biomineralization occurs in a phylogenetically basal lineage of cyanobacteria raises interesting evolutionary questions related to the antiquity of this process. Gloeobacterales is the only cyanobacterial order branching out before the chloroplast clade in molecular phylogenies of conserved gene markers (Fig.3) (24). Furthermore, its only described species, *Gloeobacter violaceus*, lacks thylakoids, which is considered an ancestral character (25). Whether *Ca. G. lithophora* contains thylakoids or not remains to be determined unambiguously. *G. violaceus* was isolated from limestone biofilms (15). Interestingly, most environmental sequences forming the large Gloeobacterales clade come from thermophilic microbial mats, rock-associated biofilms or stromatolites (Fig. 3). This association indicates a preference for these types of substrates and suggests that Gloeobacterales ancestors may have also exhibited the capacity to form biofilms in moderately hot and/or calcifying environments. The discovery of intracellular carbonate-precipitating cyanobacteria may provide an alternative and/or complementary explanation for the so-called “Precambrian enigma” (3), namely the lack of (extracellularly-) calcified microfossils in Precambrian stromatolites. Cyanobacterial microfossils form by extracellular precipitation of carbonates within cyanobacterial sheaths (6). Two types of causes, both highly debated, are proposed to explain the absence of cyanobacterial microfossils in Precambrian stromatolites. Either the Precambrian ocean composition was unsuitable for calcium carbonate precipitation in cyanobacterial sheaths (6) or most ancestral cyanobacteria lacked the physiological capability to provoke extracellular carbonate precipitation (2). The possibility that intracellular instead of extracellular mineralization was the ancestral calcification mode used by dominant calcifying (including sheathed) cyanobacteria provides a new possible explanation for the absence of microfossils in the ancient geological record. Extracellular calcification might have appeared secondarily, possibly by advent of a process inhibiting intracellular precipitation. Intracellular calcification might have been overlooked so

far because of the use of inappropriate analytical techniques and/or the specificity of chemical conditions necessary for it to occur and/or the paucity of the species able to calcify intracellularly. Future investigations will be needed to address that issue. In contrast, the search for traces of intracellular calcification in the geological record in the form of Ba- and Sr-rich carbonates will be difficult considering the possibility of abiotic formation of these phases (26). At any rate, a better understanding of the extent of intracellular calcification in modern environments and the genes and molecular mechanisms involved will be essential not only to evaluate the significance of a process that challenges the common view of how calcifying cyanobacteria have impacted the formation of calcium carbonate deposits over the Earth's history but also to determine how this new type of intracellular biomineralization in bacteria occurs.



213 **Figures captions**

214 **Fig.1.** Visualization of cyanobacterial cells forming intracellular mineral inclusions. **A**,  
215 Composite epifluorescence and optical microscopy images showing rod-shaped  
216 autofluorescent cyanobacteria cells. **B**, Optical image shows intracellular inclusions in  
217 cyanobacterial cells (higher magnification in insert). **C-F**, SEM images (Secondary Electron  
218 mode) showing cells of the same morphotype, which systematically contain bright  
219 intracellular inclusions. **G-I**, CSLM (**G**), phase contrast (**H**) and SEM (**I**) images of exactly  
220 the same area showing that autofluorescent cells observed by CLSM contain the bright  
221 inclusions observed by SEM (insert). A different, larger and inclusion-deprived  
222 cyanobacterial morphotype appears on the right.

223 **Fig.2.** Chemical and mineralogical characterization of intracellular inclusions. **A**, SEM-EDXS  
224 spectrum and associated chemical maps obtained on inclusions. Only Ca, Mg, Sr and Ba are  
225 specifically associated with the inclusions whereas S is distributed over the whole cells. **B**,  
226 Selected area electron diffraction pattern of an intracellular inclusion (insert) showing a broad  
227 ring characteristic of an amorphous phase. **C**, average XANES spectra with associated map  
228 (insert) measured at the C K-edge on areas showing only cellular material (yellow) and areas  
229 containing inclusions (blue). Spectra are shifted respectively to each other along the y axis for  
230 reader's clarity. Each spectrum has thus a different origin in y. The peak at 290.3eV, only  
231 visible in the blue spectrum, shows unambiguously that the inclusions are composed of  
232 carbonates. Peak labels are reported in table S4. **D**, XANES spectrum measured at the Ca L<sub>2,3</sub>-  
233 edges on intracellular inclusions. This spectrum is compared with spectra of reference calcite,  
234 aragonite, strontianite, and benstonite. The XANES spectrum of the intracellular inclusions  
235 matches that of benstonite in peak energy position and relative peak intensities. Peak positions  
236 are reported in table S5.

237 **Fig.3.** Phylogenetic position of the intracellularly calcifying cyanobacterium *Candidatus*  
238 *Gloeomargarita lithophora*. Maximum likelihood (ML) phylogenetic tree of cyanobacterial  
239 SSU rDNAs, constructed from 1,191 unambiguously aligned positions. Sequences obtained  
240 from various enrichment cultures were 100% identical (pink) and very closely related to the  
241 environmental sequence Alchichica\_AQ1\_1\_1C\_35 CyanoOTU02, abundantly retrieved from  
242 cultured microbialites. Numbers at nodes indicate bootstrap values. The scale bar indicates the  
243 number of substitutions per site for a unit branch length.

245 **References and notes**

246

- 247 1. A. Herrero, E. Flores, *The cyanobacteria Molecular Biology, Genomics and*  
248 *Evolution*. C. A. Press, Ed., (Norfolk, UK, 2008).
- 249 2. C. Jansson, T. Northen, Calcifying cyanobacteria-the potential of biomineralization for  
250 carbon capture and storage. *Curr. Opin. Biotechnol.* **21**, 365 (2010).
- 251 3. R. Riding, Cyanobacterial calcification, carbon dioxide concentrating mechanisms,  
252 and Proterozoic–Cambrian changes in atmospheric composition. *Geobiol.* **4**, 299  
253 (2006).
- 254 4. W. Altermann, J. Kazmierczak, A. Oren, D. T. Wright, Cyanobacterial calcification  
255 and its rock-building potential during 3.5 billion years of Earth history. *Geobiol.* **4**,  
256 147 (2006).
- 257 5. J. Farquhar, A. L. Zerkle, A. Bekker, Geological constraints on the origin of oxygenic  
258 photosynthesis. *Photosynthesis Res.* **107**, 11 (2011).
- 259 6. G. Arp, A. Reimer, J. Reitner, Photosynthesis-induced biofilm calcification and  
260 calcium concentrations in phanerozoic oceans. *Science* **292**, 1701 (2001).
- 261 7. M. Merz, The biology of carbonate precipitation by cyanobacteria. *Facies* **26**, 81  
262 (1992).
- 263 8. N. Planavsky, R. P. Reid, T. W. Lyons, K. L. Myshrall, P. T. Visscher, Formation and  
264 diagenesis of modern marine calcified cyanobacteria. *Geobiol.* **7**, 566 (2009).
- 265 9. C. Dupraz *et al.*, Processes of carbonate precipitation in modern microbial mats.  
266 *Earth-Sci. Rev.* **96**, 141 (2009).
- 267 10. M. Obst *et al.*, Precipitation of amorphous CaCO<sub>3</sub> (aragonite-like) by cyanobacteria:  
268 A STXM study of the influence of EPS on the nucleation process. *Geochim.*  
269 *Cosmochim. Acta* **73**, 4180 (2009).
- 270 11. M. R. Badger, D. Hanson, G. D. Price, Evolution and diversity of CO<sub>2</sub> concentrating  
271 mechanisms in cyanobacteria. *Funct. Plant Biol.* **29**, 161 (2002).
- 272 12. E. Kupriyanova *et al.*, Extracellular carbonic anhydrases of the stromatolite-forming  
273 cyanobacterium *Microcoleus chthonoplastes*. *Microbiology* **153**, 1149 (2007).
- 274 13. J. Kaźmierczak *et al.*, Hydrochemistry and microbialites of the alkaline crater lake  
275 Alchichica, Mexico. *Facies*, 1 (2011).
- 276 14. E. Couradeau *et al.*, Prokaryotic and Eukaryotic Community Structure in Field and  
277 Cultured Microbialites from the Alkaline Lake Alchichica (Mexico). *PLoS ONE* **6**,  
278 e28767 (2011).
- 279 15. R. Rippka, Recognition and Identification of Cyanobacteria. *Methods Enzymol.* **167**,  
280 28 (1988).
- 281 16. K. Benzerara *et al.*, Scanning transmission X-ray microscopy study of microbial  
282 calcification. *Geobiol.* **2**, 249 (2004).
- 283 17. M. E. Fleet, X. Y. Liu, Calcium L(2,3)-edge XANES of carbonates, carbonate apatite,  
284 and oldhamite (CaS). *Am. Mineral.* **94**, 1235 (2009).

18. G. E. Bath *et al.*, Strontium and barium uptake in aragonitic otoliths of marine fish. *Geochim. Cosmochim. Acta* **64**, 1705 (2000).
19. M. R. Krejci *et al.*, Selectivity in biomineralization of barium and strontium. *J Struct Biol* **176**, 192 (2011).
20. D. C. Dominguez, Calcium signaling in bacteria. *Mol. Microbiol.* **54**, 291 (2004).
21. L. Addadi, S. Raz, S. Weiner, Taking advantage of disorder: Amorphous calcium carbonate and its roles in biomineralization. *Adv. Mater.* **15**, 959 (2003).
22. P. Rez, A. Blackwell, Ca L23 Spectrum in Amorphous and Crystalline Phases of Calcium Carbonate. *J. Phys. Chem. B*, null (2011).
23. A. E. Walsby, P. K. Hayes, R. Boje, The gas vesicles, buoyancy and vertical distribution of cyanobacteria in the Baltic Sea. *Eur. J. Phycol.* **30**, 87 (1995).
24. L. I. Falcon, S. Magallon, A. Castillo, Dating the cyanobacterial ancestor of the chloroplast. *ISME J.* **4**, 777 (2010).
25. S. Tabata *et al.*, Complete genome structure of *Gloeobacter violaceus* PCC 7421, a cyanobacterium that lacks thylakoids. *DNA Res.* **10**, 137 (2003).
26. E. Bittarello, D. Aquilano, Self-assembled nanocrystals of barium carbonate in biomineral-like structures. *European Journal of Mineralogy* **19**, 345 (2007).

**Acknowledgements** E.C. was recipient of a fellowship from the French Ministère de la Recherche et de l'Enseignement Supérieur. This project was financed by the French Centre National de la Recherche Scientifique - CNRS Interdisciplinary program "Environnements planétaires et origines de la vie" (PID EPOV) and Institut National des Sciences de l'Univers - INSU program "InteractionsTerre/Vie" (InterrVie). The SEM facility of the Institut de Minéralogie et de Physique des Milieux Condensés is supported by Région Ile de France grant SESAME 2006 I-07-593/R, INSU-CNRS, INP-CNRS, University Pierre et Marie Curie, Paris. ALS-MES beamline 11.0.2 is supported by the Director, Office of Science, Office of Basic Energy Sciences, Division of Chemical Sciences, Geosciences, and Biosciences and Materials Sciences Division of the US Department of Energy at the Lawrence Berkeley National Laboratory. Beamline 5.3.2 at the ALS is supported by the Office of Basic Energy Sciences of the US Department of Energy under contract No. DE-AC02-05CH11231. Rosaluz Tavera from Universidad Autónoma de México is thanked for providing help as a field guide. We thank the laboratoire de Géochimie des eaux at IGP for providing the facility for Gran measurements.

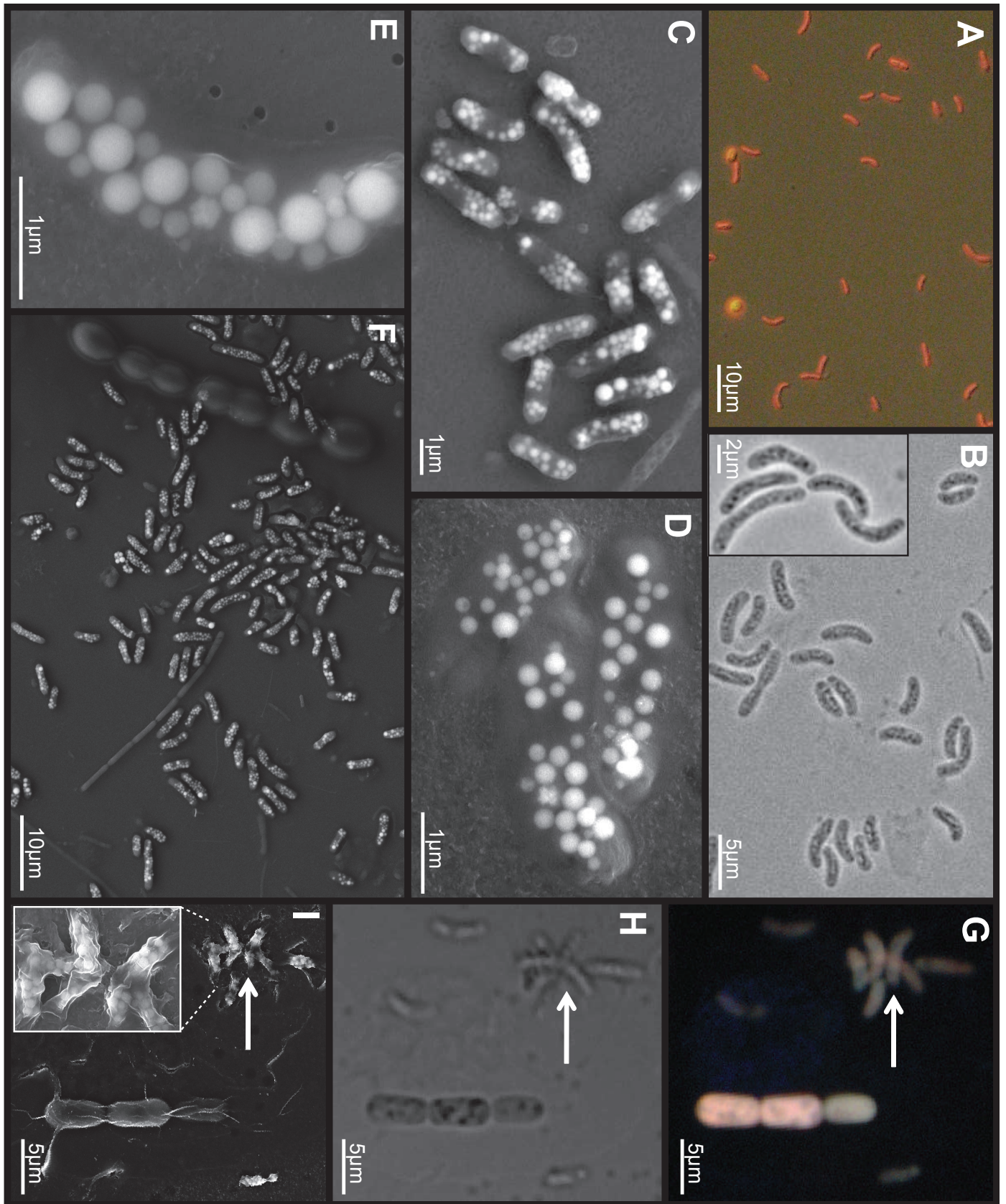
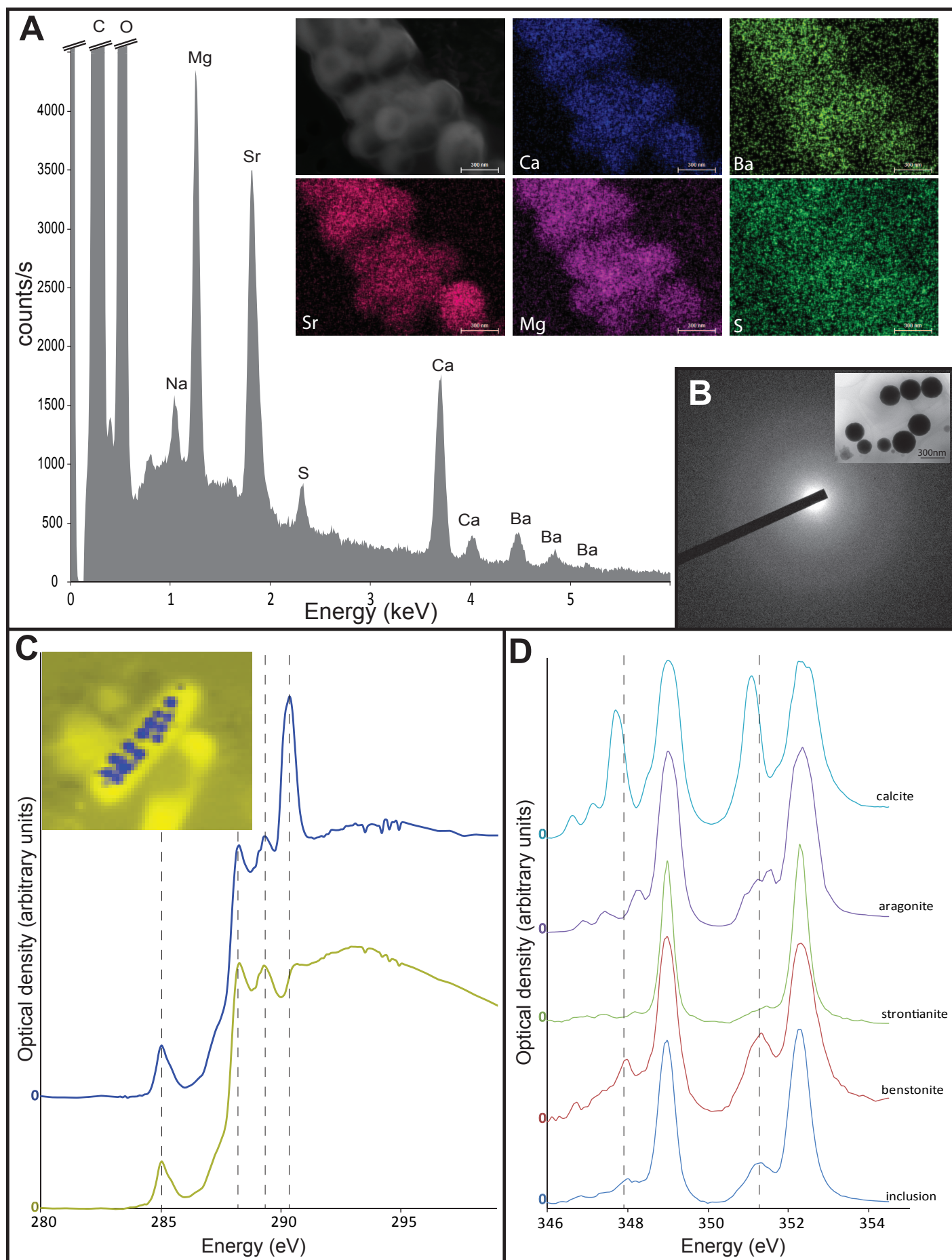
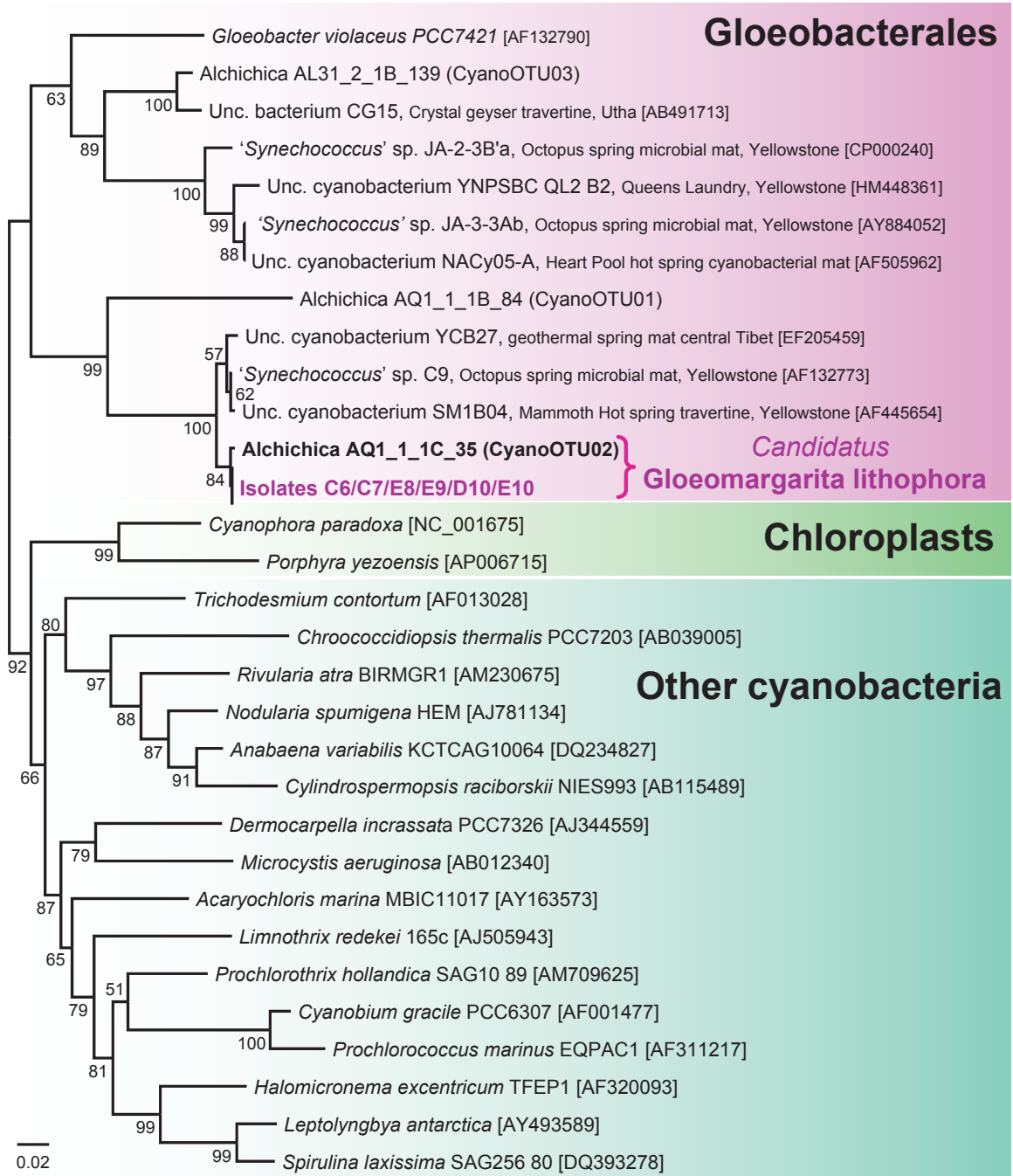


Figure 1





**Figure 2**



**Figure 3.** Couradeau et al.



## Supporting Online Material for

### An Early-Branching Microbialite Cyanobacterium Forms Intracellular Carbonates

Estelle Couradeau, Karim Benzerara, Emmanuelle Gérard, David Moreira, Sylvain Bernard, Gordon E. Brown Jr. and Purificación López-García

correspondence to: [karim.benzerara@impmc.jussieu.fr](mailto:karim.benzerara@impmc.jussieu.fr)

#### **This PDF file includes:**

Materials and Methods  
Figs. S1 to S4  
Tables S1 to S7  
References (1-38)



## **Materials and Methods**

### Site description and sample collection

The original microbialite samples were collected from Lake Alchichica (N 19°25.119; W 97° 23.860, Puebla State, Mexico) in July 2007. Large microbialite fragments (>10 cm) from 30 cm, 3 m and 8 m depth were placed in sterile plastic containers filled with lake water for transfer to a laboratory aquarium. The aquarium was illuminated with 15w -10 lumens/W fluorescent tubes producing solar spectral wavelength. Photoperiod was adjusted to 12 h of daylight. Temperature and pH were measured once a month and water loss due to evaporation replaced by distilled water. Despite some temperature variation over time for over 3 years after collection, pH remained remarkably constant at 8.9, i.e., identical to the average pH in the lake (14).

### Enrichment cultures

Large pieces of biofilms growing on the aquarium glass wall were collected in a 50 mL falcon tube. After mechanical disruption of the biofilm, the suspension was filtered through an isopore Millipore filter measuring 3 µm in diameter. The filtrate (< 3 µm fraction size) served as an inoculum for cultures. Two different culture media derived from the BG11 (ATCC 616) were prepared. The first medium, called BG11-AL33 was prepared following the BG11 medium recipe provided by the Pasteur Collection (<http://www.crbip.pasteur.fr/fiches/fichemedium.jsp?id=539>). Moreover, 50g/l of powdered microbialite fragments from Lake Alchichica were added to the medium before autoclaving. We added in the second medium, BG11-SrBa, 20 nM of SrCO<sub>3</sub> and 4 nM of BaCO<sub>3</sub>. Enrichment cultures were initially performed on a 96-well plate. Each well received 150 µL of BG11-AL33 and 10, 5, 2, 1, 0.5 or 0.1 µL of inoculum. Wells were then covered with a gas permeable adhesive sheet (AB-0718 Thermo Scientific, France). Cultures were placed on a culture chamber at 25 °C illuminated with fluorescent tubes 16 h per day. Cultures were followed by optical microscopy. Six wells out of the 96 showed a single type of unicellular rod-shaped cyanobacterial morphotype after 4 weeks of culture. They served as inoculum for subsequent cultures in BG11-SrBa medium and for molecular and microscopy analyses. We note that this morphotype was present in more than 6 wells but in association with other cyanobacteria. Consequently, this proportion (6 out of 96) cannot be properly used for quantification. We note however that there are other hints pointing at the abundance of this morphotype: 1. the abundance of 16S rRNA gene sequences (up to 20% of cyanobacterial sequences as indicated in the manuscript) and 2. SEM observations (see Fig. 1).

### Small subunit rRNA gene sequencing and phylogenetic reconstruction

In order to identify cyanobacteria in enrichment cultured, we amplified and sequenced the cyanobacterial SSU rDNA. 1 µL of culture from the 6 chosen wells was directly added to PCR (Polymerase Chain Reaction) Go Taq master mix (Promega). We used specific cyanobacterial primers CYA106F (CGGACGGGTGAGTAACGCGTGA) (27) and 23S30R (CTTCGCCTCTGTGTGCCTAGGT). PCR reactions were performed under the following conditions: 10 cycles with a decreasing annealing temperature from 65 °C to 55 °C followed by 20 cycles (denaturation at 94 °C for 15 s, annealing at 50–55 °C for 30 s, extension at 72 °C for 2 min) preceded by 2 min denaturation at 94 °C, and

followed by 7 min extension at 72 °C. PCR products were directly sequenced (~800 bp) by Beckman Coulter Genomics (Takeley, United Kingdom) using first the Cya106F forward primer and the 1492R as reverse universal primer for bacteria. We assembled good quality contig sequences of about 1500 bp. The closest relatives to these sequences were identified by BLAST (28, 29) and retrieved from GenBank (<http://ncbi.nlm.nih.gov/>) and used to reconstruct phylogenetic trees including also sequences from representative species across cyanobacterial taxa. Sequences were aligned using MAFFT (30) and the multiple alignment was manually edited using the program ED from the MUST package (31). Maximum likelihood (ML) phylogenetic trees were reconstructed using TREEFINDER (32) applying a general time reversible (GTR) model of sequence evolution, and taking among-site rate variation into account by using a four-category discrete approximation of a  $\Gamma$  distribution. Maximum likelihood bootstrap proportions were inferred using 1,000 replicates. Phylogenetic trees were viewed using FIGTREE (33).

#### Optical and confocal laser scanning microscopy (CLSM)

Samples were examined using both a Zeiss Axioplan 2 optical microscope customized with a Zeiss Filterset 26 and a Canon PowerShot G5 camera and a Leica DM6000B LT customized with a black and white Leica DFC340FX camera. Dry samples were also observed using a FluoView™ FV1000 confocal laser scanning microscope with a spectral resolution of 2 nm (Olympus). The FluoView™ FV1000 was equipped with a 405 nm laser diode, and multi-line argon (458 nm, 488 nm, and 515 nm), helium-neon-green (543 nm) and helium-neon-red (633 nm) lasers. Fluorescence images were obtained with concomitant excitation at wavelengths of 405 nm, 488 nm, and 543 nm and collection of the emitted fluorescence between 425-475 nm, 500-530 nm, and 560-660 nm, respectively. Spectral acquisitions were acquired by illuminating the sample with one laser (405, 488, 536, 633 nm) at a time and collecting the emitted fluorescence in 10 nm windows with a step of 5 nm. After CLSM observation, samples were dehydrated in a gradual series of ethanol baths (50%, 70% and 100%) for SEM analyses.

#### Scanning electron microscopy (SEM) and energy dispersive x-ray spectrometry (EDXS)

Samples previously observed by CLSM were prepared as indicated above. Some samples from aquaria and enrichment cultures were observed by SEM only. They were filtered on 0.2  $\mu$ m diameter isopore Millipore filters then dried and coated with carbon. Images were collected in backscattered and secondary electron modes using a Zeiss Ultra 55 FEG-SEM operating at 10 kV, a 30  $\mu$ m aperture and a working distance between 3 and 8 mm. The lateral resolution achieved by the microscope is 1.1 nm at 20 kV and 2.5 nm at 1 kV. Elemental compositions were determined semi-quantitatively using energy dispersive x-ray spectrometry (EDXS) using an EDS QUANTAX system equipped with a silicone drift detector XFlash 4010 (Bruker) after copper calibration. Standard-based data analyses were performed using the software Esprit (Bruker) following the P/B ZAF procedure. The spectral resolution is 129 eV at 100 kcts and the detection limit is estimated at ~ 1% atomic concentration. These analyses were performed at 20 keV, using a 60  $\mu$ m aperture and a working distance of 7.5 mm.

### STXM and XANES spectroscopy

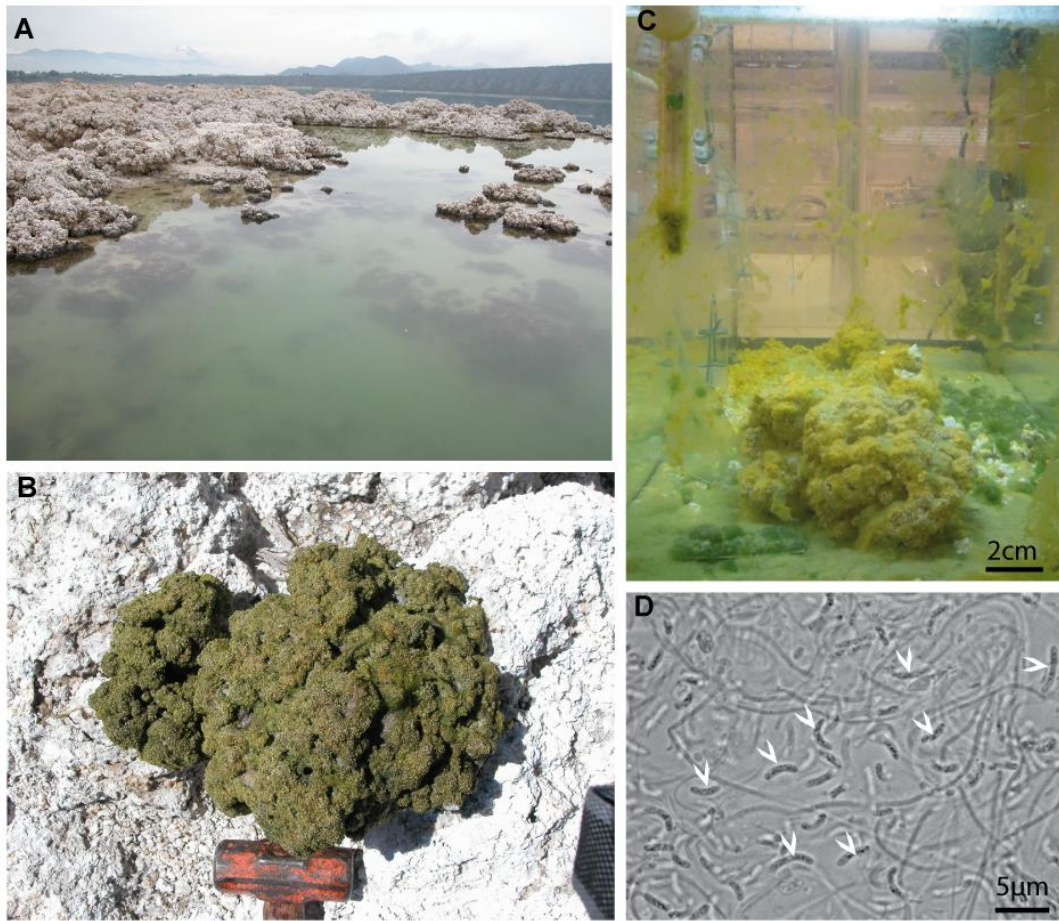
Scanning transmission X-ray microscopy (STXM) and X-ray absorption near-edge structure (XANES) spectroscopy measurements were carried out on Molecular Environmental Science 11.0.2.2 beamline and the Polymer STXM 5.3.2.2 beamline at the Advanced Light Source (ALS, Berkeley, USA) (34). Measurements were performed at the C K-edge and the Ca L<sub>2,3</sub>-edges, following procedures described in Bluhm et al. (2006) (35). ALS storage ring was operated at 1.9 GeV and 500 mA current. A 1200 l/mm grating and 35 µm exit slits were used for carbon spectroscopy, providing a theoretical energy resolution better than 100 meV. The step size for images was 40 nm. Energy calibration was done using the well-resolved 3p Rydberg peak at 294.96 eV of gaseous CO<sub>2</sub> and the L<sub>3</sub> most intense peak of calcite at 349.3 eV (36). Methods used for STXM data acquisition and analysis and examples of STXM applications can be found, for example, in (16) and (10). AXis2000 software was used to extract XANES spectra from image stack measurements and STXM map construction.

### Transmission electron microscopy

TEM observations were carried out on a JEOL2100F (JEOL Ltd, Japan) microscope operating at 200 kV, equipped with a field emission gun, a high resolution UHR pole piece, and a US4000 GATAN camera. The lateral resolution achieved by the microscope is 1.9 Å at 200 kV. Selected area electron diffraction (SAED) was performed using the smallest aperture allowing retrieval of diffraction patterns from a 100 nm x 100 nm area.

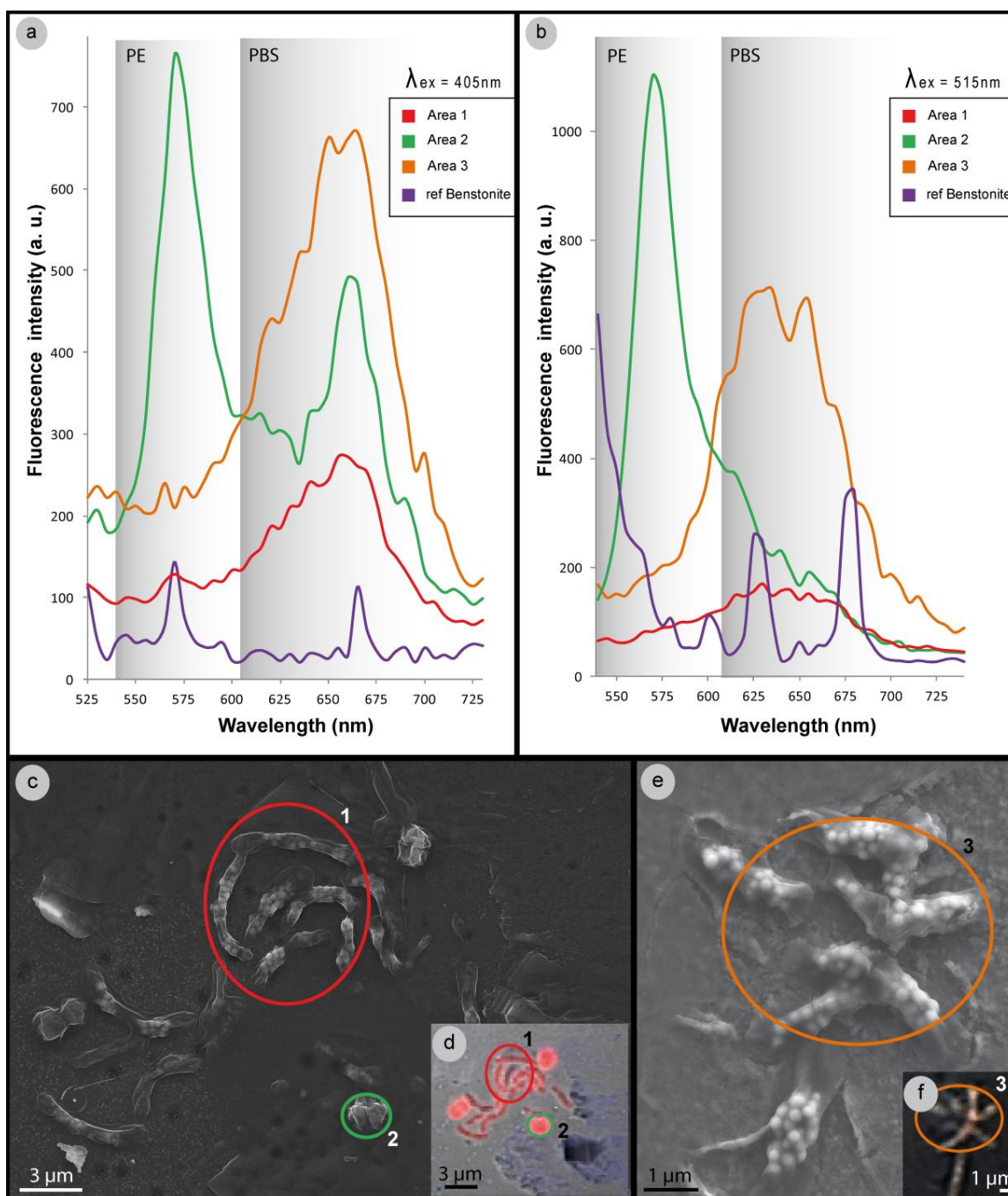
### Water chemistry analysis

Solution analyses were performed by the Service d'Analyse des Roches et des Minéraux (SARM) in Nancy, France. Water samples were filtered (0.2 µm) and acidified using suprapur HNO<sub>3</sub> (Merck) at 2 mol.L<sup>-1</sup>. Concentrations of major elements (e.g., Mg and Ca) were measured using an Inductively Coupled Plasma-Optical Emission Spectrometer (ICP-OES) Icap 6500 (Thermo Scientific) after calibration with mono-element solution. Data were collected using the radial torch mode. Detection limits were 0.05 mg.L<sup>-1</sup> for Ca and 0.5 mg.L<sup>-1</sup> for Mg. Trace element concentrations, including Ba and Sr, were measured using an inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometer (ICP-MS) Elan 6000 (Perkin Elmer) after calibration with multi-elements solution. Detection limits were 0.015 µg.L<sup>-1</sup> for Ba and 0.1 µg.L<sup>-1</sup> for Sr. Control of measurement quality was performed every five analysis using the SLRS4 standard ([http://www.nrc-cnrc.gc.ca/obj/inms-ienm/doc/crm-mrc/fra/SLRS-4\\_f.pdf](http://www.nrc-cnrc.gc.ca/obj/inms-ienm/doc/crm-mrc/fra/SLRS-4_f.pdf)). More details about sample preparation and procedures used by the SARM can be found in (37). Total alkalinity was measured by the method described by Gran (38) using the Tiamo control software for automatic titrator (Metrohm). Saturation indexes (SI) of aragonite, hydromagnesite and strontianite were calculated using the Visual Minteq 3.0 software (<http://www2.lwr.kth.se/English/OurSoftware/vminteq/> developed by Jon Petter Gustafsson at KTH, Sweden), based on the thermodynamic database minteq.tdb. SI is defined as log(IAP/Ksp), where IAP is the ion activity product and Ksp the solubility of the phase at a given temperature. The solution is oversaturated with the mineral phase if SI>0. Saturation index of the phase forming within *Ca* G. lithophora cells could not be calculated since its solubility is not known.



**Fig. S1.**

Lake Alchichica sampling site and aquarium cultures of microbialites. (A) Shores of Lake Alchichica showing a high amount of microbialites (B) Alchichica microbialite shortly after sampling. (C) Microbialite fragment cultured in a laboratory aquarium for 18 months. Note the green biofilm growing on the aquarium glass wall. Samples of this biofilm were studied by microscopy and served as an inoculum for enrichment cultures. (D) Light microscopy image of an undisturbed biofilm where *Ca* *G. lithophora* cells are visible (see arrows) in association with filamentous cyanobacteria and other bacteria.

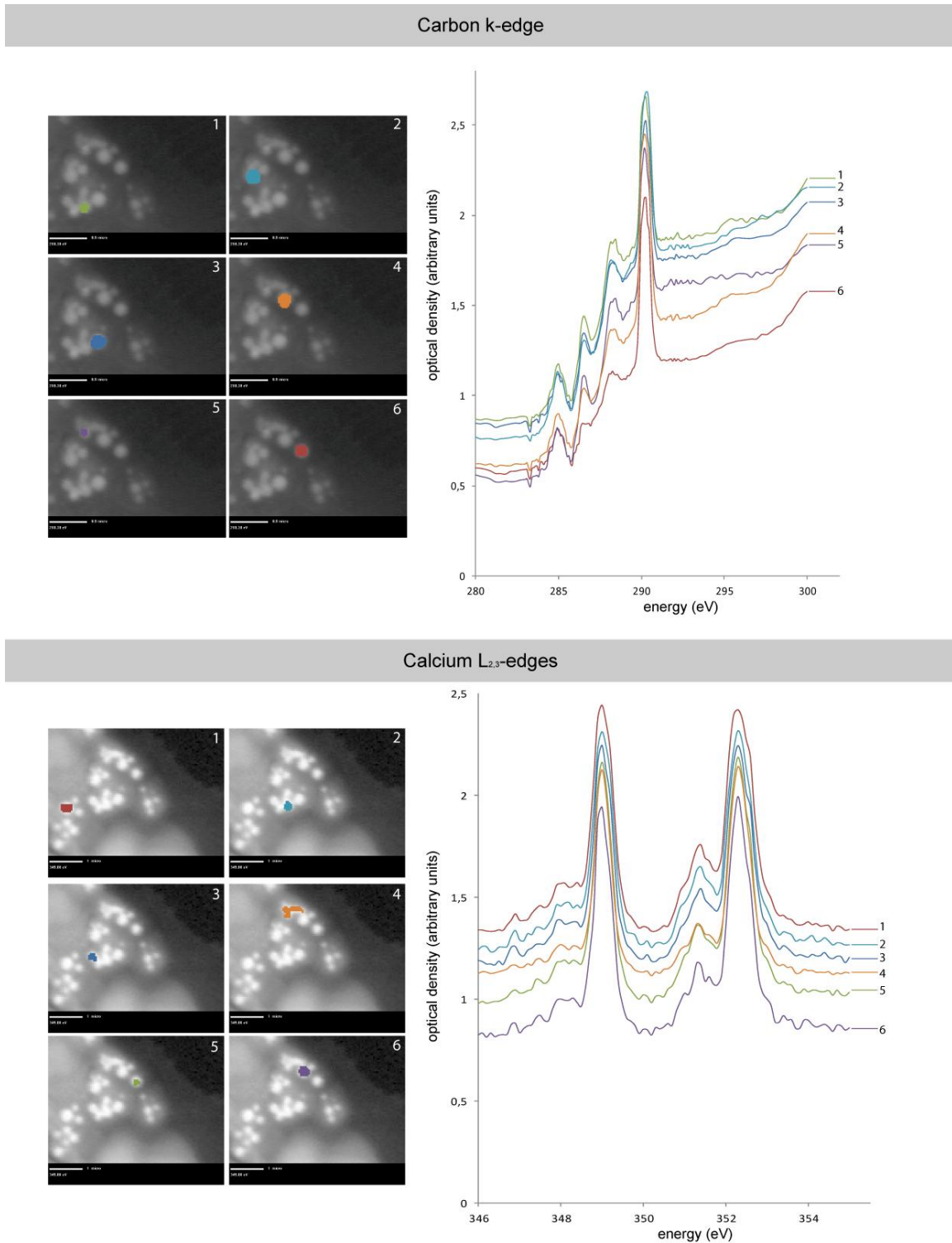


**Fig. S2**

Identification of pigments in aquarium *Ca G. lithophora* cells by CLSM. (A) Lambda scan spectral profiles measured using a 405 nm excitation wavelength. Autofluorescence of phycoerythrin (PE, first maximum) is detected at ~565 nm; autofluorescence of Chlorophyll-a plus other phycobiliproteins (PBS, second maximum) is detected at ~660 nm. Area 1 (red) and area 3 (orange) correspond to *Ca G. lithophora* cells, while area 2 (green) corresponds to round-shaped cyanobacterium cells (blue). These analyses show the absence of PE in *Ca G. lithophora* cells. (B) Lambda scan spectral profiles measured using a 515 nm excitation wavelength. Fluorescence peaks of phycoerythrin and

chlorophyll appear at approximately the same positions as in (A). Lambda scan spectral profile measured on reference benstonite (purple) is shown for comparison. Some narrow peaks appear at varying positions depending on the excitation wavelength. (C) and (D): SEM and corresponding CLSM images showing *Ca* G. lithophora cells (area 1) and unidentified non-calcifying cyanobacteria (area 2) on which fluorescence spectra were measured. (E) and (F): SEM and corresponding CLSM images showing additional *Ca* G. lithophora cells on which fluorescence spectra were measured (area 3).

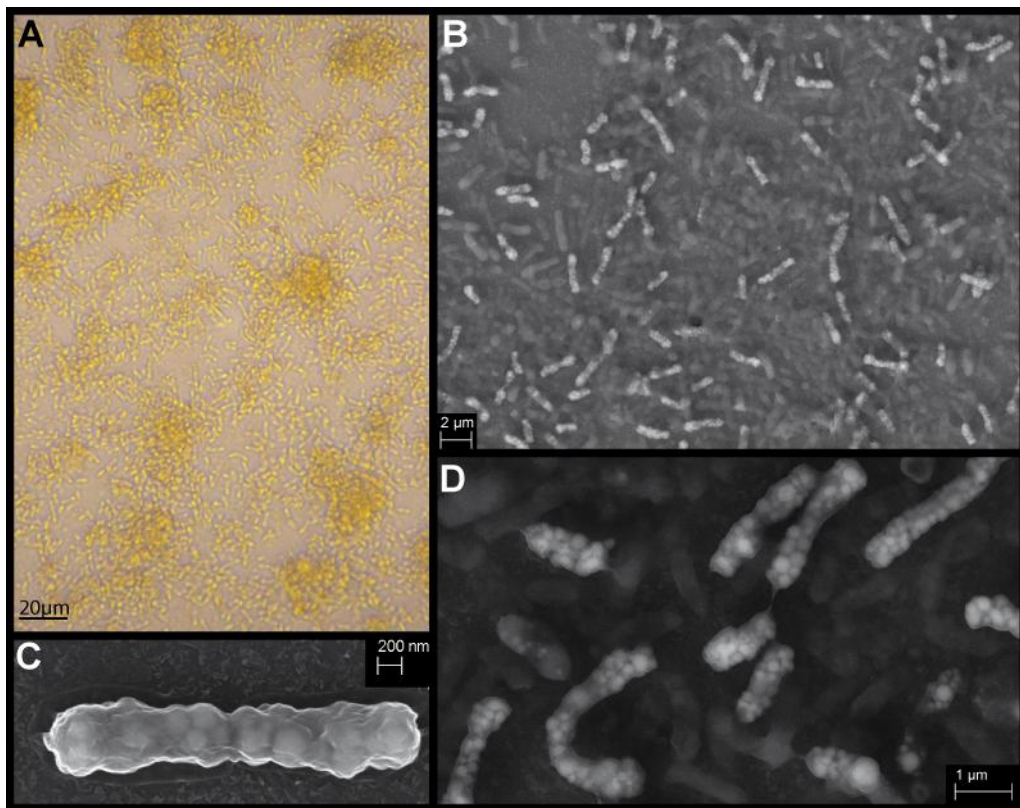




**Fig. S3**

STXM analyses of single intracellular inclusions at the C K-edge and the Ca  $L_{2,3}$ -edges. **C K-edge, (Left)** 1-6: STXM images showing a cluster of *Ca G. lithophora* cells. On each image, a single inclusion is outlined with a color code similar to that used for

XANES spectra shown on the right. **C K-edge, (Right)** XANES spectra measured at the C K-edge on corresponding areas shown on the left. All spectra are similar. Moreover, they systematically show a peak at 290.3eV, which is characteristic of  $1s-\pi^*$  electronic transitions in carbonate groups. **Ca L<sub>2,3</sub>-edges, (Left) 1-6:** STXM images showing a cluster of *Ca* G. lithophora cells. On each image, a single inclusion is outlined with a color code similar to that used for XANES spectra shown on the right. **Ca L<sub>2,3</sub>-edges, (Right)** XANES spectra measured at the Ca L<sub>2,3</sub>-edges on areas shown on the left. All spectra are similar and show high similarity with the XANES spectrum of benstonite (see Fig. 2).



**Fig. S4**

(A) Light microscopy image showing the enrichment culture C6 in liquid BG11 medium;  
(B-D) SEM images (secondary electron mode) of intracellular carbonate inclusion in cultured *Ca* G. lithophora.

	Width (µm)	Length (µm)	Number of inclusion/cell	Diameter of inclusion (nm)
Number of measurements	33 cells	33 cells	44 cells	90 inclusions
<b>Average</b>	<b>1.1</b>	<b>3.9</b>	<b>21</b>	<b>270.3</b>
Standard deviation	0.1	0.6	5	44
Maximum value	1.54	5.1	34	525
Minimum value	0.9	2.72	13	116

**Table S1.**

Size measurements performed on *Ca* G. lithophora cells and inclusions

Element	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12	Average
carbon	71.72	76.17	78.34	78.41	75.24	76.78	75.74	74.38	76.04	77.56	79.55	78.32	<b>76.52</b> ±2.15
oxygen	26.64	22.75	20.32	19.59	23.49	22.49	23.36	24.08	22.89	21.47	19.56	20.84	<b>22.29</b> ±2.06
sodium	0.10	0.04	0.06	0.08	0.06	0.05	0.05	0.09	0.06	0.06	0.05	0.06	<b>0.06</b> ±0.02
magnesium	0.22	0.14	0.16	0.52	0.17	0.10	0.20	0.26	0.21	0.17	0.14	0.11	<b>0.20</b> ±0.11
calcium	0.80	0.56	0.61	1.05	0.72	0.38	0.44	0.72	0.52	0.45	0.45	0.35	<b>0.59</b> ±0.20
strontium	0.08	0.05	0.05	0.15	0.15	0.08	0.10	0.12	0.10	0.06	0.06	0.06	<b>0.09</b> ±0.04
barium	0.40	0.27	0.41	0.18	0.15	0.10	0.10	0.34	0.14	0.20	0.18	0.25	<b>0.23</b> ±0.11
sulfur	0.02	0.02	0.02	0.02	0.01	0.02	0.01	0.00	0.02	0.03	0.00	0.01	<b>0.01</b> ±0.01
potassium	0.02	0.00	0.03	0.00	0.01	0.00	0.01	0.01	0.02	0.02	0.02	0.00	<b>0.01</b> ±0.01

**Table S2.**

Chemical composition of intracellular inclusion (atom%) measured by SEM-EDXS. Measurements were performed after copper calibration. Semi-quantitative analyses were processed by the phi-rho-z method using the ESPRIT software. Twelve (1-12) independent measurements were performed on distinct inclusions. 100,000 counts were recorded for each measurement. Mean and standard deviations  $\sigma$  are indicated in the last column.

pH	Temperature	Alkalinity ( $\mu\text{M HCO}_3^-$ )	Ion concentration				Saturation Index (SI)		
			Ca	Mg	Sr	Ba	Aragonite $\text{CaCO}_3$	Hydromagnesite $(\text{Mg}_5(\text{CO}_3)_4(\text{OH})_2 \cdot 4(\text{H}_2\text{O}))$	Strontianite $\text{SrCO}_3$
$8.9 \pm 0.08$	$24 \pm 1.8^\circ\text{C}$	13617	1.9 mg/l	169 mg/l	1.1 $\mu\text{g/l}$	0.2 $\mu\text{g/l}$	0.158	0.261	-2.426

**Table S3.**

Chemical composition of aquarium solution and saturation index of aragonite, hydromagnesite and strontianite.

C K-edge XANES peak positions ( $\pm 0.1$ eV)	Electronic Transition	Functional Groups *
285	$1s \rightarrow \pi^*$	Aromatic
288.2	$1s \rightarrow \pi^*$	Amides - Peptides $\text{NH}_2\text{-C=O}$
289.3	$1s \rightarrow \sigma^*$	Carbonyl $\text{C=O}$
290.3	$1s \rightarrow \pi^*$	Carbonates

\*Peaks labeling based on K. Benzerara *et al.* (2004), Scanning transmission X-ray microscopy study of microbial calcification. *Geobiol.* **2**, 249.

**Table S4.**

Indexation of major C K-edge XANES peaks observed in Figure 2C (vertical dotted lines)

Mineral name	Ca $\text{L}_{2,3}$ -edge XANES peak positions ( $\pm 0.1$ eV)
<b>Calcite</b> ( $\text{CaCO}_3$ )	346.6 / 347.1 / 347.7 / 349 / 351 / 352.4
<b>Aragonite</b> ( $\text{CaCO}_3$ )	346.9 / 347.4 / 348.3 / 349 / 351.4 / 352.4
<b>Strontianite</b> ( $\text{Sr,CaCO}_3$ )	348.2 / 349 / 351.6 / 352.4
<b>Benstonite</b> ( $\text{Sr}_{1.5}\text{Ba}_{4.5}\text{Ca}_6\text{Mg}(\text{CO}_3)_{13}$ )	346.8 / 347.5 / 348 / 349 / 351.4 / 352.4
<b>Ca.G.lithophora inclusions</b>	346.9 / 347.5 / 348 / 349 / 351.4 / 352.4

**Table S5.** Detailed lists of peak positions in XANES spectra of Ca-containing minerals (see spectra in Figure 2D).

	Formula	Molar mass	Density
<b>Benstonite</b>	$(\text{Sr}_{1.5}\text{Ba}_{4.5})\text{Ca}_6\text{Mg}(\text{CO}_3)_{13}$	1794	3.6
<b>Ca. G.lithophora inclusions</b>	$(\text{Sr}_1\text{Ba}_{2.7}\text{Mg}_{1.4}\text{Ca}_{0.9})\text{Ca}_6\text{Mg}(\text{CO}_3)_{13}$	1580	<b>3.2</b>

**Table S6.**

Density of benstonite and *Ca. G. lithophora* intracellular inclusions

	Average values
Width of one cell (W)	1.15 $\mu\text{m}$
Length of one cell (L)	3.95 $\mu\text{m}$
Radius of one cell ( $R=W/2$ )	0.55 $\mu\text{m}$
Volume of one cell (considered as a cylinder + 2 hemispheres at the tips)	3.66 $\mu\text{m}^3$
Radius of one inclusion (r)	133.5 nm
Volume of one inclusion (considered as a sphere)	9966264 nm <sup>3</sup>
Number of inclusions per cell	20
Cell density (Baldwin 1995*)	1
Inclusion density	3.2
Percentage of cell volume filled by inclusions	<b>6%</b>
Percentage of cell mass increase by presence of intracellular inclusion	<b>12%</b>

\*W Baldwin, R Myer, T Kung, E Anderson, and A L Koch (1995) Growth and buoyant density of *Escherichia coli* at very low osmolarities. *J Bacteriol.* 177: 235–237

**Table S7.**

**Calculation of cell mass increase in the presence of intracellular inclusions.** The width and length of cells and the radius of inclusions (averaged as spheres) are measured. The cell volume is calculated by modeling the cell as a cylinder and two hemispheres at the tips. The density of a cell with no intracellular inclusion is assessed to be 1.

## References

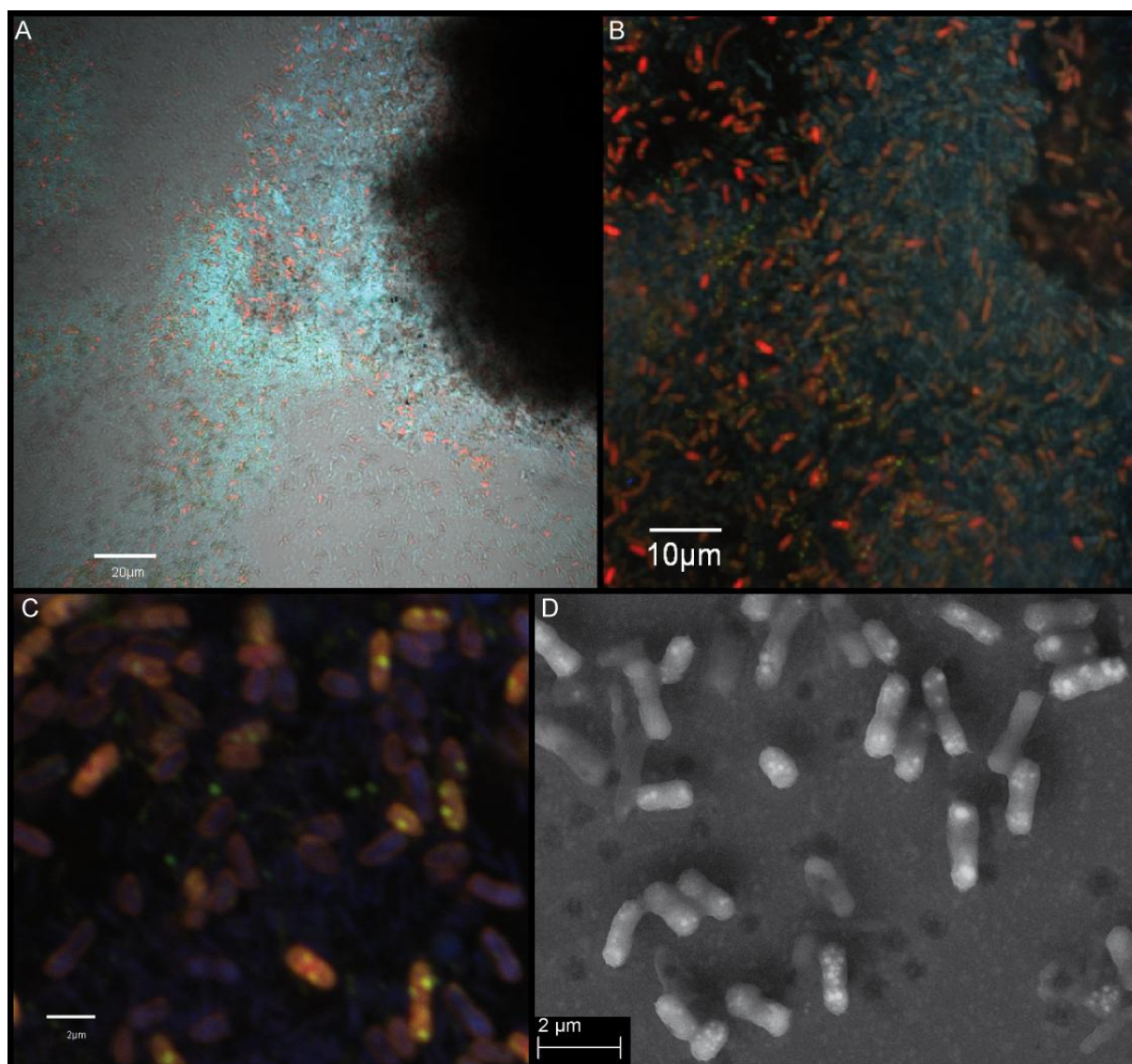
1. A. Herrero, E. Flores, *The cyanobacteria Molecular Biology, Genomics and Evolution*. C. A. Press, Ed., (Norfolk, UK, 2008).
2. C. Jansson, T. Northen, Calcifying cyanobacteria-the potential of biomineralization for carbon capture and storage. *Curr. Opin. Biotechnol.* **21**, 365 (2010).
3. R. Riding, Cyanobacterial calcification, carbon dioxide concentrating mechanisms, and Proterozoic–Cambrian changes in atmospheric composition. *Geobiol.* **4**, 299 (2006).
4. W. Altermann, J. Kazmierczak, A. Oren, D. T. Wright, Cyanobacterial calcification and its rock-building potential during 3.5 billion years of Earth history. *Geobiol.* **4**, 147 (2006).
5. J. Farquhar, A. L. Zerkle, A. Bekker, Geological constraints on the origin of oxygenic photosynthesis. *Photosynthesis Res.* **107**, 11 (2011).
6. G. Arp, A. Reimer, J. Reitner, Photosynthesis-induced biofilm calcification and calcium concentrations in phanerozoic oceans. *Science* **292**, 1701 (2001).
7. M. Merz, The biology of carbonate precipitation by cyanobacteria. *Facies* **26**, 81 (1992).
8. N. Planavsky, R. P. Reid, T. W. Lyons, K. L. Myshrall, P. T. Visscher, Formation and diagenesis of modern marine calcified cyanobacteria. *Geobiol.* **7**, 566 (2009).
9. C. Dupraz *et al.*, Processes of carbonate precipitation in modern microbial mats. *Earth-Sci. Rev.* **96**, 141 (2009).
10. M. Obst *et al.*, Precipitation of amorphous CaCO<sub>3</sub> (aragonite-like) by cyanobacteria: A STXM study of the influence of EPS on the nucleation process. *Geochim. Cosmochim. Acta* **73**, 4180 (2009).
11. M. R. Badger, D. Hanson, G. D. Price, Evolution and diversity of CO<sub>2</sub> concentrating mechanisms in cyanobacteria. *Funct. Plant Biol.* **29**, 161 (2002).
12. E. Kupriyanova *et al.*, Extracellular carbonic anhydrases of the stromatolite-forming cyanobacterium *Microcoleus chthonoplastes*. *Microbiology* **153**, 1149 (2007).
13. J. Kazmierczak *et al.*, Hydrochemistry and microbialites of the alkaline crater lake Alchichica, Mexico. *Facies*, 1 (2011).
14. E. Couradeau *et al.*, Prokaryotic and Eukaryotic Community Structure in Field and Cultured Microbialites from the Alkaline Lake Alchichica (Mexico). *PLoS ONE* **6**, e28767 (2011).
15. R. Rippka, Recognition and Identification of Cyanobacteria. *Methods Enzymol.* **167**, 28 (1988).
16. K. Benzerara *et al.*, Scanning transmission X-ray microscopy study of microbial calcification. *Geobiol.* **2**, 249 (2004).
17. M. E. Fleet, X. Y. Liu, Calcium L(2,3)-edge XANES of carbonates, carbonate apatite, and oldhamite (CaS). *Am. Mineral.* **94**, 1235 (2009).
18. G. E. Bath *et al.*, Strontium and barium uptake in aragonitic otoliths of marine fish. *Geochim. Cosmochim. Acta* **64**, 1705 (2000).
19. M. R. Krejci *et al.*, Selectivity in biomineralization of barium and strontium. *J Struct Biol* **176**, 192 (2011).
20. D. C. Dominguez, Calcium signaling in bacteria. *Mol. Microbiol.* **54**, 291 (2004).



21. L. Addadi, S. Raz, S. Weiner, Taking advantage of disorder: Amorphous calcium carbonate and its roles in biomineralization. *Adv. Mater.* **15**, 959 (2003).
22. P. Rez, A. Blackwell, Ca L23 Spectrum in Amorphous and Crystalline Phases of Calcium Carbonate. *J. Phys. Chem. B*, null (2011).
23. A. E. Walsby, P. K. Hayes, R. Boje, The gas vesicles, buoyancy and vertical distribution of cyanobacteria in the Baltic Sea. *Eur. J. Phycol.* **30**, 87 (1995).
24. L. I. Falcon, S. Magallon, A. Castillo, Dating the cyanobacterial ancestor of the chloroplast. *ISME J.* **4**, 777 (2010).
25. S. Tabata *et al.*, Complete genome structure of *Gloeobacter violaceus* PCC 7421, a cyanobacterium that lacks thylakoids. *DNA Res.* **10**, 137 (2003).
26. E. Bittarello, D. Aquilano, Self-assembled nanocrystals of barium carbonate in biomineral-like structures. *European Journal of Mineralogy* **19**, 345 (2007).
27. U. Nubel, F. Garcia-Pichel, G. Muyzer, PCR primers to amplify 16S rRNA genes from cyanobacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**, 3327 (1997).
28. S. F. Altschul *et al.*, Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* **25**, 3389 (1997).
29. Z. Zhang, S. Schwartz, L. Wagner, W. Miller, A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *J. Comput. Biol.* **7**, 203 (2000).
30. K. Katoh, K. Misawa, K. Kuma, T. Miyata, MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. *Nucleic Acids Res.* **30**, 3059 (2002).
31. H. Philippe, MUST, a computer package of management utilities for sequences and trees. *Nucleic Acids Res.* **21**, 5264 (1993).
32. G. Jobb, A. von Haeseler, K. Strimmer, TREEFINDER: a powerful graphical analysis environment for molecular phylogenetics. *BMC Evol. Biol.* **4:18**, (2004).
33. A. Rambaut (2009) FIGTREE <http://tree.bio.ed.ac.uk/>
34. A. L. Kilcoyne *et al.*, Interferometer-controlled scanning transmission X-ray microscopes at the Advanced Light Source. *J Synchrotron Radiat* **10**, 125 (2003).
35. H. Bluhm *et al.*, Soft X-ray microscopy and spectroscopy at the molecular environmental science beamline at the Advanced Light Source. *J. Electron Spectrosc. Relat. Phenom.* **150**, 86 (2006).
36. Rieger *et al.*, *Electronic structure of the CaF[2]/Si(111) interface*. (American Physical Society, Woodbury, NY, ETATS-UNIS, 1986), vol. 34.
37. J. Carignan, P. Hild, G. Mevelle, J. Morel, D. Yeghicheyan, Routine Analyses of Trace Elements in Geological Samples using Flow Injection and Low Pressure On-Line Liquid Chromatography Coupled to ICP-MS: A Study of Geochemical Reference Materials BR, DR-N, UB-N, AN-G and GH. *Geostandards Newsletter* **25**, 187 (2001).
38. G. Gran, Determination of the equivalence point in potentiometric titrations. Part II. *Analyst* **77**, 661 (1952).

### III. Données supplémentaires

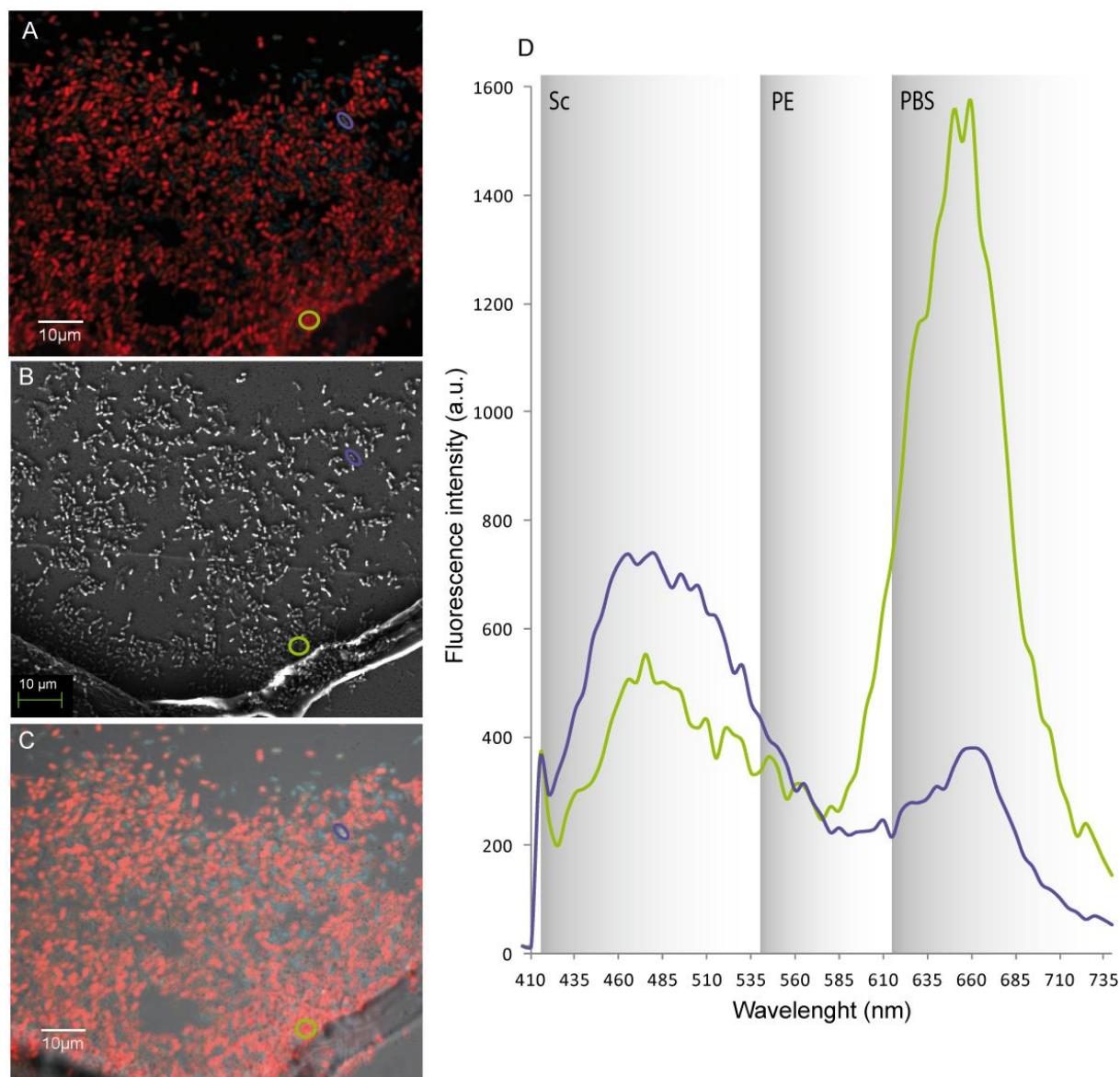
#### A. Données de CLSM et SEM sur les cultures de *Ca. Gloeomargarita lithophora*



**Figure 18 :** Observation de *Ca. Gloeomargarita lithophora* en culture (enrichissement D10). (A) Image confocale de la culture superposée à l'image en contraste de phase. On note que certaines cellules présentent une fluorescence naturelle quand elles sont excitées simultanément par les lasers 405/488/543, certaines fluorescent dans le rouge (fausse couleur rouge) alors que d'autres fluorescent dans le bleu (fausse couleur bleue). (B, C) Images CLSM de la même culture, certaines cellules présentent en plus des taches qui fluorescent dans le vert (fausse couleur verte) intenses dont l'origine n'est pas connue. (D) Image en microscope électronique à balayage (mode électron secondaire) de l'enrichissement D10. On note que les cellules sont de petite taille en comparaison des

## CHAPITRE 3

mesures faites sur *Ca. G. lithophora* dans les échantillons de l'aquarium (d'une longueur de 3,9  $\mu\text{m}$  en moyenne).



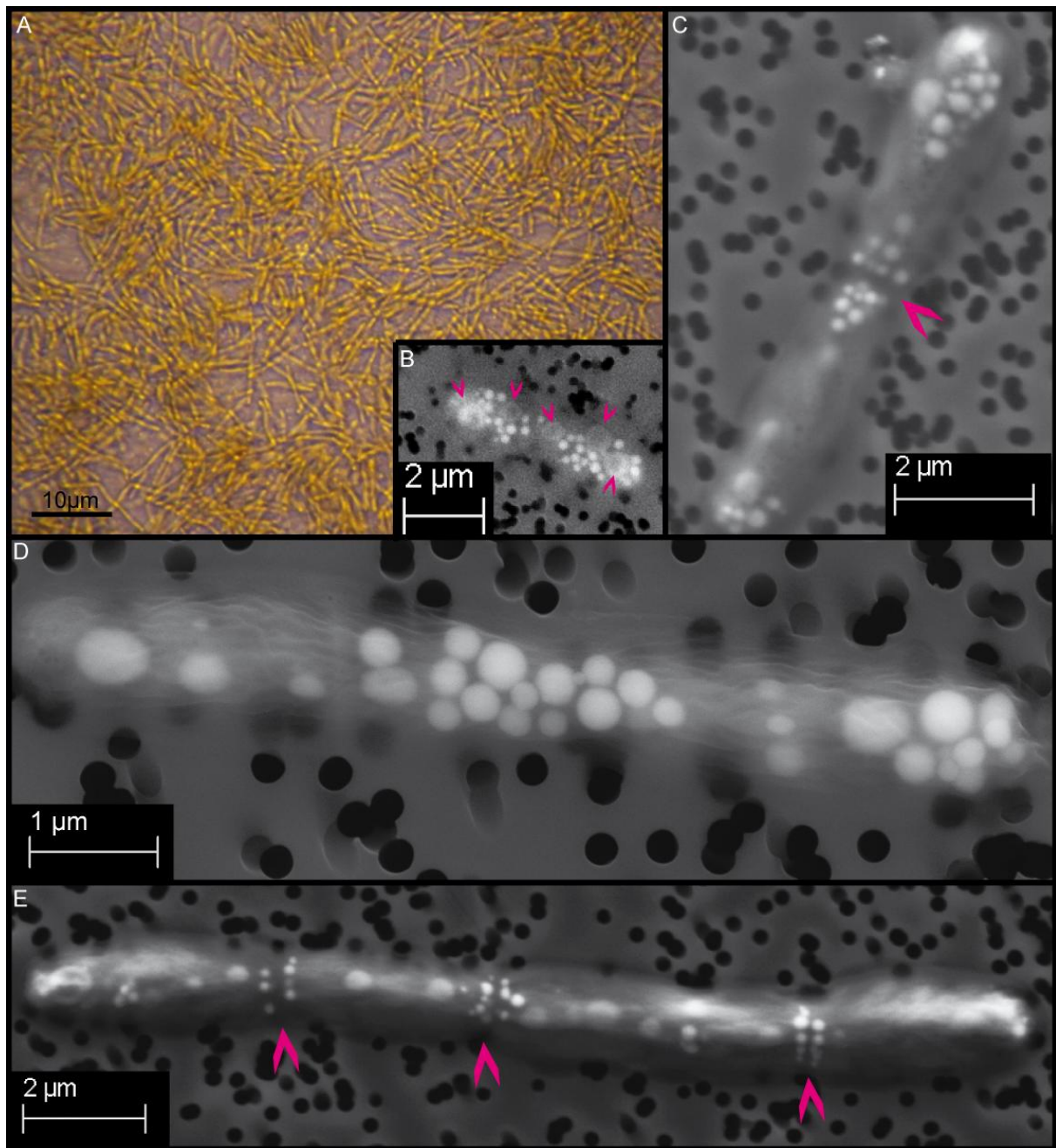
**Figure 19 :** Acquisition spectrale de la fluorescence émise par les cellules de *Ca. G. lithophora* en culture (enrichissement D10). **(A)** Image CLSM d'une portion de la culture. **(B)** Image en microscope électronique à balayage (mode électrons secondaires) de la même zone. **(C)** Image CLSM superposée à l'image en contraste de phase de la même zone. Localisation des zones d'acquisition spectrale (cercles vert et violet) **(A-C)**. **(D)** Spectre de la fluorescence émise au niveau des zones repérées par des cercles verts et violets lors d'une excitation avec un laser à 405 nm. On note la présence d'une bande dans la zone PBS (Chlorophylle, Phycocyanine et Allophycocyanine) et l'absence de Phycoerythrine (PE), qui reflète la composition pigmentaire typique de la souche. On observe une autre bande centrée autour de 480 nm particulièrement intense dans les cellules qui fluorescent dans le bleu et qui correspond à la scytonémine, pigment photoprotecteur.

### CHAPITRE 3

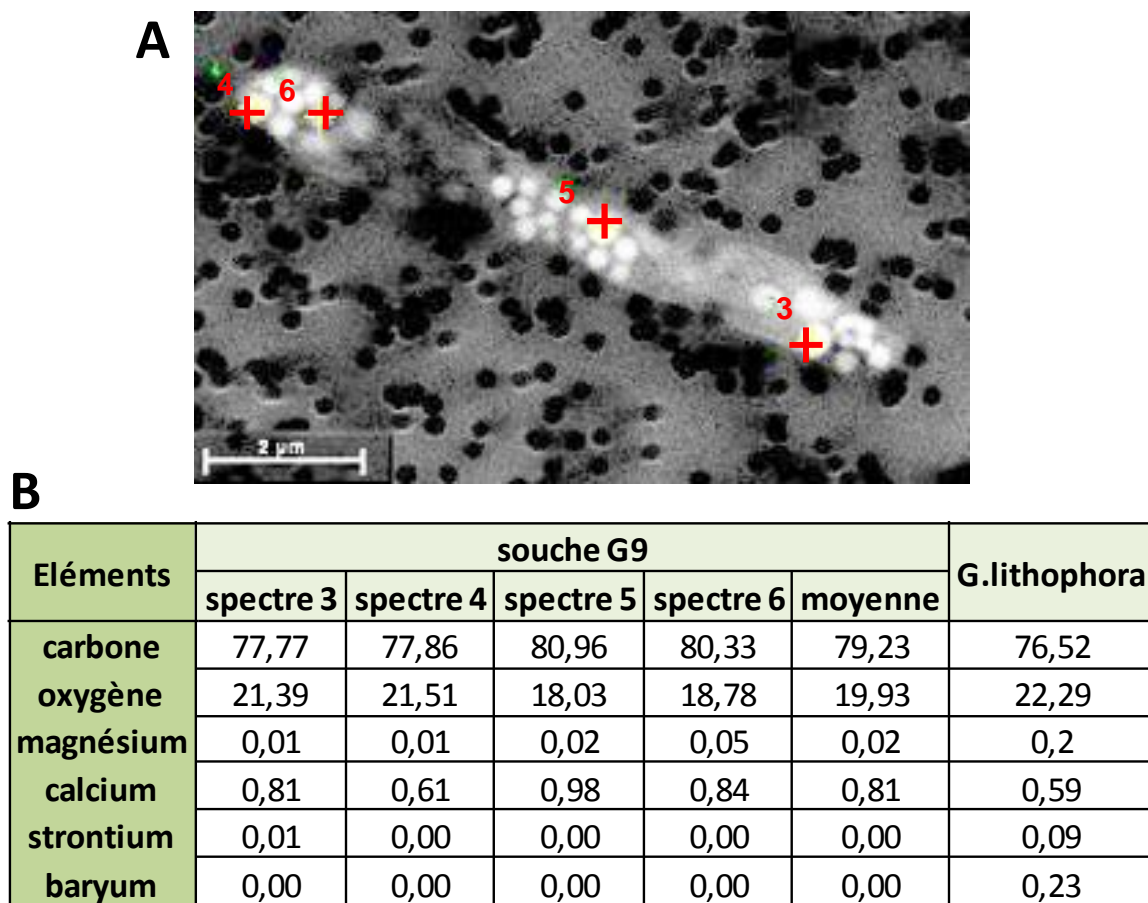
La [figure 19](#) montre que dans les cultures enrichies, les cellules de *Ca. G.lithophora* ne présentent pas toutes le même spectre de fluorescence. Certaines ont une auto-fluorescence rouge intense alors que d'autres fluorescent dans le bleu. Par ailleurs la taille et la quantité des inclusions intracellulaires varient grandement d'une culture à l'autre, la taille des cellules également. Ainsi la souche D10 ([figure 18](#)) présentait au moment des observations des cellules plutôt petites par rapport aux cellules décrites dans les biofilms de l'aquarium et avec des inclusions minérales également plus petites. Ces observations posent la question de la dynamique de croissance des inclusions intracellulaires : est-ce que ce sont des structures labiles ? Comment sont-elles réparties lors de la division cellulaire ? Leur production dépend-elle de l'activité photosynthétique des cellules ? Une investigation plus poussée sera nécessaire pour aborder ces questions.



## B. Une deuxième souche capable de biominéralisation intracellulaire dans l'ordre des Chroococcales

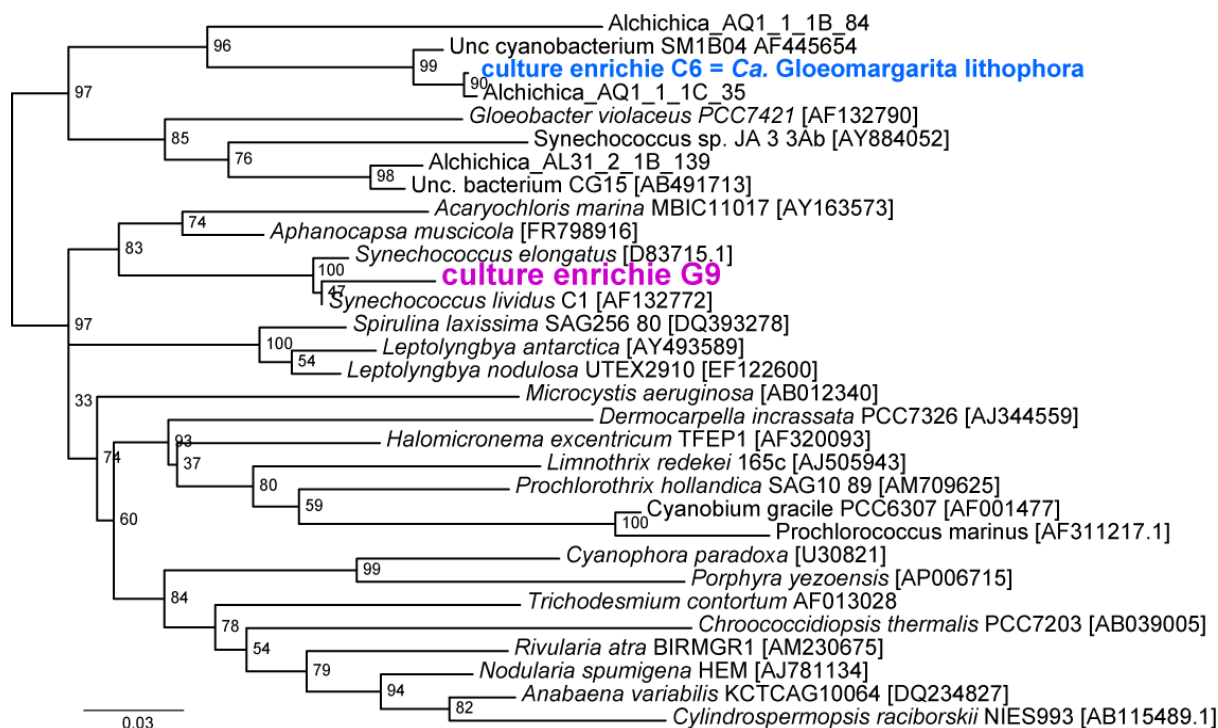


**Figure 20 :** Images de la culture enrichie G9 appartenant à l'ordre des Chroococcales. **(A)** photo en microscopie optique de la culture. On note la forme des cellules en bâtonnets beaucoup plus allongés que chez *Ca. G.lithophora*. **(B-E)** Photo en microscopie électronique à balayage (mode électrons secondaire). Les flèches en **(B)** indiquent la présence de structures plus sombres qui sont sans doute des carboxysomes. Les flèches en **(C)** et **(E)** indiquent des lieux dans la cellule qui semblent correspondre à une zone de division, les inclusions sont abondantes et de petite taille au niveau de ces interfaces.



**Figure 21** : Analyse EDX des inclusions de la souche G9. (A) Localisation des points où les spectres ont été acquis pour l'analyse semi-quantitative. (B) Pourcentage atomique extrapolé à partir de chaque spectre selon la méthode  $\phi\rho z$  avec le logiciel Esprit. Les valeurs dans les inclusions de Ca. G.lithophora dans l'aquarium sont rappelées ici pour comparaison.

## CHAPITRE 3



**Figure 22 :** Position phylogénétique des cyanobactéries provenant de l'enrichissement G9 et de l'espèce *Ca. Gloeomargarita lithophora* dans le phylum des cyanobactéries. Reconstruction phylogénétique du marqueur SSU rDNA par maximum de vraisemblance en utilisant 908 positions conservées. On observe que l'enrichissement G9 ne groupe pas au sein des Gloeobacterales mais est proche de l'espèce *Synechococcus lividus* dans l'ordre des Chroococcales. Les chiffres aux nœuds indiquent les valeurs de bootstrap. La barre d'échelle indique le nombre de substitutions par site par unité de longueur de branche.

Lors des essais d'enrichissement en culture de *Ca. G. lithophora*, une autre souche a révélé un phénotype assez similaire, la souche G9 (Figure 20). Cette souche avait été sélectionnée sur des critères morphologiques, elle présentait également une morphologie en bâtonnets et un cytoplasme granuleux. Cependant dans ce cas, les cellules sont plus étroites et plus allongées que dans le cas de *Ca. G. lithophora*.

Les images réalisées en SEM sur la souche G9 (Figure 20) montrent que les cellules présentent des inclusions intracellulaires mais leur répartition est polaire contrairement au cas de *Ca. G. lithophora* où les inclusions sont réparties dans l'ensemble du cytoplasme. De plus on observe la présence d'inclusions plus petites au niveau de zones de constriction qui font penser à des septums. La dynamique de mise en place des inclusions dans cette souche a donc l'air différent de ce qui a été observé chez *Ca. G. lithophora*.



### CHAPITRE 3

Ensuite les analyses EDX préliminaires (Figure 21) réalisées sur quelques cellules de la souche G9 montrent que celles-ci sont plus riches en calcium mais ne contiennent pas ou très peu de baryum et de strontium. A ce stade de nos recherches, nous ne pouvons pas savoir si les inclusions de la souche G9 ont vraiment des inclusions de minéralogie différente de celle de *Ca. G. lithophora* ou si ce sont seulement les conditions chimiques du milieu de culture synthétique plus pauvre en Ba et Sr par rapport à l'eau du milieu naturel qui conditionnent la prédominance du calcium dans les inclusions. Des analyses EDX sur les inclusions intracellulaires des enrichissements de la souche *Ca. G. lithophora* seront nécessaires pour déterminer si le milieu de culture permet ou non la production d'inclusions riches en Ca, Mg, Sr et Ba comme c'est le cas dans le biofilm de l'aquarium.

Enfin de la même façon que dans le cas de *Ca. G. lithophora*, le SSU rDNA de la souche G9 a été amplifié et séquencé. Ceci a permis d'affilier cette bactérie à l'ordre des Chroococcales proche de l'espèce *Synechococcus lividus* (Figure 22). Cette dernière information tendrait à prouver que la biominéralisation intracellulaire chez les cyanobactéries pourrait être un processus plus général et pas seulement limité à la souche *Ca. G. lithophora* décrite parmi les Gloeobacterales. Si la biominéralisation intracellulaire n'avait pas été mise en évidence auparavant chez les cyanobactéries c'est peut-être que celle-ci est spécifique du milieu où elles ont été trouvées, c'est-à-dire un biofilm se développant dans une solution très sursaturée vis-à-vis de différents minéraux carbonatés. Il serait alors intéressant de regarder plus systématiquement les cyanobactéries associées aux biofilms calcifiants pour savoir s'il y a une relation entre l'environnement minéralisateur et la synthèse d'inclusions minérales. Il est à noter que *Ca. G. lithophora* continue à faire des inclusions intracellulaires en culture dans le milieu BG11 qui n'est pourtant pas un environnement minéralisateur. Il s'agirait donc d'une réelle adaptation physiologique de ces souches et pas d'un phénotype uniquement lié à leur milieu naturel. Il n'en demeure pas moins que cette adaptation a pu être sélectionnée en relation avec leur milieu d'origine fortement sursaturé.

Si *Ca. G. lithophora* et la souche G9 font le même type de biominéralisation, alors : (i) soit le mécanisme de la biominéralisation intracellulaire est homologue dans les deux souches et a été hérité d'un ancêtre commun, c'est-à-dire ici l'ancêtre de toutes les cyanobactéries, (ii) soit ce mécanisme est apparu indépendamment dans les deux lignées (par convergence évolutive), (iii) soit il a été acquis par transfert horizontal. Il sera passionnant de décrypter les bases génétiques et moléculaires du processus de biominéralisation intracellulaire afin d'apporter des éléments de réponse à ces questions.

## CHAPITRE 3

Enfin il est possible que les inclusions intracellulaires soient importantes dans la formation des microbialites. En effet ces carbonates amorphes s'ils sont libérés dans le milieu seraient des germes très efficace pour la cristallisation de phases carbonatées (*Addadi et al. 2003; Politi et al. 2008*). Il faudrait également estimer leur contribution massique potentielle en prenant en compte le nombre d'inclusions produites par cellule et le taux de division cellulaire. Un point essentiel serait alors de purifier les inclusions intracellulaires et de déterminer leur résistance au milieu extérieur. En effet il est connu que les carbonates amorphes sont particulièrement instables mais peuvent être stabilisés notamment par l'association avec un réseau de molécules organiques (*Addadi et al. 2003*).

## Discussion générale et Perspectives

### A. Comment se forment les microbialites du lac d'Alchichica ?

Les métabolismes des microorganismes associés aux microbialites d'Alchichica décrits dans la première partie ont été identifiés en faisant l'hypothèse que deux séquences proches correspondent à des organismes ayant des métabolismes similaires. Nous avons ainsi mis en évidence que les métabolismes proposés dans le modèle des stromatolites des Bahamas (*Dupraz et al. 2005; Dupraz et al. 2009*) sont également potentiellement présents dans les microbialites d'Alchichica. Ainsi le modèle établi sur les communautés marines des Bahamas pourrait au premier ordre être appliqué au cas d'Alchichica.

Il semblerait que dans le cas des microbialites modernes, les grands groupes métaboliques et phylogénétiques soient les mêmes en milieu marin et en milieu lacustre. Le fait d'être associé à un microbialite, c'est-à-dire un milieu minéralisateur, serait donc un élément plus structurant des communautés que la différence chimique/dynamique du milieu eau de mer *versus* eau douce, du point de vue des métabolismes dominants. Ceci demeure hypothétique et il est vrai qu'il est très difficile d'aborder ce genre de question à une échelle phylogénétique plus fine et donc plus pertinente tant la diversité microbienne est grande dans ces systèmes. Cependant il est apparu clairement dans le cas des cyanobactéries, que certains phylotypes étaient typiquement associés à divers milieux minéralisateurs ; entre autres le phylotype CyanoOTU35 dont le plus proche voisin est un phylotype associé aux microbialites du lac Van (Turquie) (*Lopez-Garcia et al. 2005*), le phylotype CyanoOTU13 proche d'un phylotype trouvé dans les stromatolites de Ruidera Pools (*Santos et al. 2010*) , le phylotype CyanoOTU30 proche d'un phylotype des stromatolites de Shark Bay (*Allen et al. 2009*) ou encore le phylotype CyanoOTU03 proche d'un phylotype provenant d'un travertin (*Takashima et al. 2011*). Cette observation bien que qualitative pour l'instant irait dans le même sens que celle faite à l'échelle des phylums, c'est-à-dire que le caractère minéralisateur du milieu est un élément qui sélectionne au moins en partie la diversité microbienne dans ces systèmes.

Si le modèle de formation des stromatolites des Bahamas semble être un modèle compatible avec nos données, il est à noter que nos analyses de diversité microbienne ont également souligné l'importance d'autres groupes fonctionnels de microorganismes.

## DISCUSSION & PERSPECTIVES

Notamment ceux réalisant la photosynthèse anoxygénique ou encore les hétérotrophes capables de dégrader les molécules organiques complexes qui peuvent également contribuer à la précipitation de carbonate de calcium/magnésium. La photosynthèse anoxygénique peut induire de façon directe la précipitation (*Bosak et al. 2007*) et l'hétérotrophie, par la production de petite molécules organiques qui favoriseraient l'activité des bactéries sulfato-réductrices et donc la précipitation de carbonate, agirait de façon indirecte également dans le sens de la précipitation (*Baumgartner et al. 2006*).

La mesure in-situ des conditions physico-chimiques sera un point clé pour valider le modèle de formation et également accéder à des variations temporelles d'activité dans le biofilm. On pourra envisager d'instrumenter les microbialites maintenus en aquariums avec des microsondes encapsulées (l'électrode peut être protégée dans une capsule en métal ce qui évite qu'elle se casse au contact du microbialite) pour suivre l'évolution du pH, de la teneur en O<sub>2</sub>, en HS<sup>-</sup> dans le biofilm. En effet la variation quotidienne du pH est notamment un paramètre fondamental à mesurer pour pouvoir mieux contraindre le modèle de précipitation des carbonates.

Il sera également important de visualiser les micro-organismes que l'on considère importants dans le processus de biominéralisation et de mesurer leur activité. Pour cela l'approche FISH (fluorescent in situ hybridisation) et l'utilisation de fluorophores sensibles à la concentration intracellulaire en calcium apparaissent prometteuses. Des tests de mise en évidence de certains métabolismes clés comme la sulfato-réduction avec le test colorimétrique de Pachmayr (1960) pourront également être envisagés.

Il sera sans doute nécessaire de travailler sur un système simplifié pour essayer de mieux comprendre son fonctionnement. Pour cela, on pourrait envisager une approche « top-down », en partant d'une fraction de la diversité microbienne et en caractérisant son potentiel minéralisateur. On pourrait à l'inverse essayer dans une approche « bottom-up » d'assembler des souches pures de microorganismes que nous avons identifié comme importants dans le processus de biominéralisation (par exemple une *Pleurocapsales* et une sulfato-réductrice) pour essayer de mieux comprendre leur relation et leur contribution respective à la précipitation minérale.

Nous avons démontré que les cyanobactéries sont capables d'induire la précipitation de carbonate de façon extracellulaire (Chapitre 2) et intracellulaire (Chapitre 3), il serait alors intéressant d'élargir l'étude à d'autres types métaboliques, par exemple la sulfato-réduction.

En effet des bactéries sulfato-réductrices ont été détectées (Chapitre1) et la prise en compte de leur activité pourrait permettre d'avancer sur la question de la contribution relative de la photosynthèse oxygénique et de la sulfato-réduction dans la précipitation effective de carbonate dans le cas des microbialites d'Alchichica. Par ailleurs, les carbonates formés à proximité ou dans les cyanobactéries ne représentent qu'une part minoritaire en masse des microbialites et la question du lieu de précipitation et du mode d'accrétion de l'hydromagnésite, qui est la phase majoritaire, reste entière.

Pour répondre à cette question il faudrait localiser le lieu de précipitation de l'hydromagnésite. La mesure du rapport des isotopes 12 et 13 du carbone dans l'hydromagnésite pourrait peut-être nous permettre de trancher entre une origine dans la colonne d'eau (avec la signature de l'eau) ou dans les biofilms (dans une solution relativement enrichie en  $^{13}\text{C}$ ). On pourrait également envisager un marquage en utilisant les isotopes stables du magnésium ( $^{25}\text{Mg}$  ou  $^{26}\text{Mg}$ ) pour essayer de mieux comprendre la dynamique du magnésium et de voir comment se fait l'accrétion de l'hydromagnésite. Il faudrait ensuite mieux caractériser les liens génétiques potentiels qui existent entre hydromagnésite et aragonite. En effet il serait intéressant de voir si l'on peut reproduire au laboratoire une transformation diagénétique d'aragonite en hydromagnésite comme cela a été proposé pour les microbialites d'Alchichica (*Kaźmierczak et al. 2011*). Une meilleure compréhension de ce processus sera nécessaire pour déterminer sa contribution effective à la formation d'hydromagnésite dans les microbialites d'Alchichica.

Enfin, il faudra estimer de façon plus précise la part relative du modèle biologique de précipitation des carbonates proposé ici, par rapport aux effets abiotiques, tels que l'évaporation et les apports sédimentaires dans l'accrétion effective des microbialites d'Alchichica.

### **B. Apports pour la recherche et la reconnaissance des biosignatures**

Un des objectifs de cette thèse était de déterminer grâce à un exemple moderne ce qui peut être enregistré de l'interaction entre le vivant et le minéral dans la formation des microbialites. Pour cela il s'agit d'identifier des éléments spécifiquement liés au vivant et à son activité qui peuvent être préservés dans les microbialites.

Dans ce sens le chapitre 2 fournit des perspectives prometteuses. En effet, nous avons décrit un type de microfossiles de cyanobactéries dont l'identification repose essentiellement sur une analyse texturale à nano-échelle des phases minérales associées. Ce type de microfossile est une cible intéressante à rechercher dans le registre fossile puisque *a priori*, ce type de microfossile totalement minéralisé pourrait être moins sensible à la diagénèse qu'un microfossile en partie organique. Notre étude a été faite sur une étape précoce de la taphonomie et nécessiterait également une meilleure prise en compte des processus ultérieurs (diagénèse et métamorphisme) qui pourraient effacer ces « signatures » de la vie ou les générer de façon purement abiotique.

Nous avons également mis en évidence qu'il existait un énorme biais entre la diversité que l'on peut décrire sur le biofilm vivant (chapitre 1) et la part de cette diversité que l'on est capable de reconnaître préservé dans la roche (chapitre 2). Dans ce cadre là, il apparaît délicat de proposer un modèle métabolico-géochimique de formation d'un microbialite à partir uniquement de l'étude des microfossiles qu'il contient. Cependant, la partie fossile du microbialite peut fournir d'autres types d'informations (contexte de dépôt, rapports isotopiques, minéralogie) qui, associées entre elles permettent si ce n'est de résoudre, au moins de circonscrire le champ des mécanismes possibles.

Enfin dans le chapitre 3, nous avons montré que certaines cyanobactéries étaient capables de contrôler la formation de phases carbonatées de façon intracellulaire. Certains auteurs proposent que les magnétosomes, s'ils sont préservés dans les sédiments, pourraient être des nano-signatures du vivant (*Vali et al. 1989*); de même les minéraux formés par les cyanobactéries, puisque leur minéralogie est exotique par rapport aux minéraux formés dans le même milieu de façon extracellulaire, pourraient être des marqueurs d'une l'activité biologique. Une première étape serait de tester la stabilité des phases intracellulaires produites par les cyanobactéries lorsqu'elles sont exposées dans le milieu extracellulaire.

### **C. Précipitation extracellulaire vs. intracellulaire de minéraux carbonatés par les cyanobactéries**

Les résultats présentés dans les chapitres 2 et 3 mènent naturellement à se demander s'il y a un lien entre le mécanisme de précipitation extracellulaire et le mécanisme de précipitation intracellulaire de phases carbonatées par les cyanobactéries. L'hypothèse la plus instinctive



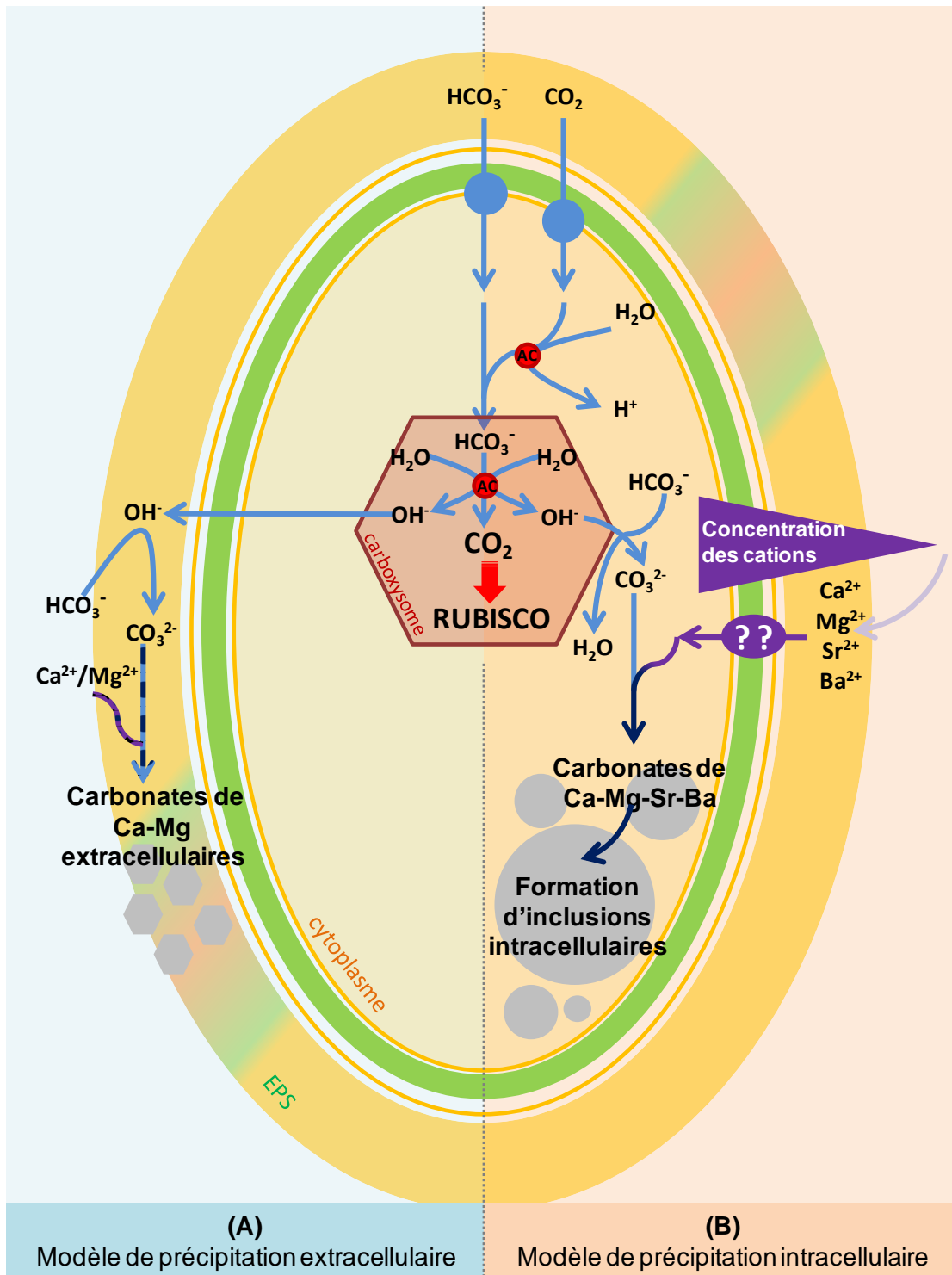
## DISCUSSION & PERSPECTIVES

serait de proposer que l'alcalinité produite par la photosynthèse, au lieu d'être exportée comme c'est proposé dans le cas de la biominéralisation extracellulaire (*Riding 2006a; Jansson et al. 2010*) resterait dans la cellule et induirait la précipitation de carbonates à l'intérieur de celle-ci (**Figure 23**). Les bases moléculaires de l'export de l'alcalinité dans le cas de la biominéralisation extracellulaire n'étant pas connues il est difficile de faire des hypothèses plus précises sur le mécanisme inverse de stockage de l'alcalinité. La relation spatiale entre l'activité anhydrase carbonique au niveau du carboxysome et la précipitation intracellulaire de carbonates pourrait être suivie grâce à l'utilisation de CO<sub>2</sub> marqué radioactivement dans une série d'expériences de type pulse-chase. En effet il serait ainsi possible de suivre l'incorporation du carbone marqué dans la matière organique et dans les carbonates. On pourrait alors savoir si les ions carbonates qui participent à la précipitation des inclusions intracellulaires viennent directement du CO<sub>2</sub> prélevé dans le milieu, s'il y a une étape au niveau du carboxysome ou si le mécanisme est plus long et fait intervenir plus d'étapes.

Il est a été proposé que la biominéralisation extracellulaire par les cyanobactéries est une conséquence de la sélection des mécanismes de concentration du carbone en relation avec la diminution du CO<sub>2</sub> atmosphérique au cours des temps géologiques (*Altermann 2006*). On pourrait proposer que (i) la biominéralisation intracellulaire et extracellulaire soient deux mécanismes ayant évolués de façon indépendante, la biominéralisation serait alors une convergence évolutive. On pourrait également proposer que (ii) la biominéralisation intracellulaire soit le mécanisme ancestral puisqu'il ne requiert pas l'export de l'alcalinité. En effet l'export de l'alcalinité peut être vu comme une étape supplémentaire du processus qui aurait été sélectionnée plus tard. Certaines lignées auraient alors gardé le mécanisme ancestral. Enfin, on pourrait à l'inverse proposer que (iii) le mécanisme ancestral est la biominéralisation extracellulaire. Alors, l'acquisition de la biominéralisation intracellulaire par certaines lignées garantirait à celles-ci de ne pas mourir par encroûtement. Dans ce cadre la biominéralisation intracellulaire peut être considéré comme une stratégie augmentant la fitness de la lignée portant ce caractère, celui-ci aurait alors été sélectionné. Ceci est à nuancer par le fait qu'il existe de nombreuses lignées de cyanobactéries qui ne font ni biominéralisation intracellulaire ni extracellulaire, la précipitation de carbonate n'est donc pas nécessairement associée à la réalisation de la photosynthèse. Or si l'activité photosynthétique augmente localement l'alcalinité et déplace l'équilibre de précipitation des carbonates, la question est alors de savoir quel est le mécanisme qui permet à certaines cyanobactéries de ne

## DISCUSSION & PERSPECTIVES

pas induire la précipitation de carbonate. Pour avancer sur cette question il faudra déterminer l'extension taxonomique de la capacité de biominéralisation intracellulaire chez les cyanobactéries, et mettre en regard ce caractère avec la phylogénie des organismes. Il sera également essentiel de mieux comprendre le/les mécanisme(s) de la biominéralisation chez les cyanobactéries. Pour cela il faudrait identifier les protéines et en particulier les enzymes impliquées et reconstruire leurs histoires évolutives au sein du phylum des cyanobactéries.



**Figure 23 :** Modèles hypothétiques de précipitation de carbonate par une cyanobactérie. (A) Modèle de précipitation extracellulaire d'après (Jansson et al. 2010). L'alcalinité issue de l'activité de l'anhydrase carbonique (AC) est exportée dans la gaine et induit la précipitation dans celle-ci. (B) Modèle de précipitation intracellulaire. L'alcalinité ne serait dans ce cas pas exportée et induirait la précipitation de carbonate à l'intérieur de la cellule.

## DISCUSSION & PERSPECTIVES

L'exploration de la voie de biominéralisation intracellulaire par les cyanobactéries sera un enjeu majeur visant à mieux comprendre le niveau de contrôle de la cellule sur la précipitation, le mécanisme de la précipitation incluant la séquestration active de cations et le contexte évolutif de ce processus.

Une meilleure caractérisation de la souche G9, de la nature des inclusions intracellulaires qu'elle contient et de leur distribution sera nécessaire pour la comparer avec la souche *Ca. G. lithophora*.

Le séquençage du génome de chaque souche (G9 et *Ca. G. lithophora*) nous apportera sans doute des informations cruciales, permettant une affiliation sans ambiguïté des souches et révélant les voies métaboliques et les éléments de structures cellulaires potentiellement présents dans les souches et qui pourraient être importants dans la biominéralisation intracellulaire. Comme dans le cas des bactéries magnétotactiques, il existe peut-être un îlot génomique dédié à la fonction biominéralisation intracellulaire.

L'expérimentation sur les cultures de cyanobactéries réalisant la biominéralisation intracellulaire permettra de déterminer si les inclusions sont ou non entourées par une membrane plasmique ou encore comment le pH/la lumière/la concentration en cations du milieu influencent leur formation. Il sera également important de comprendre la dynamique de mise en place des inclusions intracellulaires dans la cellule, de déterminer si ce sont des structures labiles. Enfin il faudra évaluer la stabilité des phases formées intracellulairement lorsqu'elles sont exposées au milieu extérieur. Ceci afin de déterminer si la minéralisation intracellulaire peut contribuer à l'accrétion du microbialite, en fabriquant des germes amorphes qui favorisent la croissance des minéraux vis-à-vis desquels la solution du milieu extérieur est sursaturée.

## Conclusions

### A. Minéralogie des microbialites d'Alchichica

Les microbialites d'Alchichica sont composés essentiellement d'hydromagnésite ( $\text{Mg}_5(\text{CO}_3)_4(\text{OH})_2 \cdot 4(\text{H}_2\text{O})$ ) et d'aragonite ( $\text{CaCO}_3$ ). En plus de ces deux phases, on trouve un silicate de fer de façon très minoritaire souvent à l'interface entre hydromagnésite et aragonite. La distribution de l'aragonite est soit périphérique associée aux biofilms, soit centrale souvent associée à la présence d'organismes endolithiques.

### B. Diversité microbienne associée aux microbialites

Notre étude a révélé une grande diversité des microorganismes au sein des domaines bactérien (344 phylotypes répartis dans 21 phylums) et eucaryote (58 phylotypes répartis dans 9 phylums) par rapport à celle des archées (2 phylotypes).

La diversité des bactéries est associée à une grande diversité de types métaboliques. Les groupes majeurs identifiés sont les photosynthétiques oxygéniques (Cyanobacteria), anoxygéniques (certains membres des Alphaproteobacteria, Chloroflexi), mais aussi beaucoup d'hétérotrophes spécialisés dans la dégradation de molécules organiques complexes (Verrucomicrobia, Planctomycetales, Bacteroidetes). Nous avons également identifié de façon minoritaire des bactéries dégradant typiquement les petites molécules organiques (telles que les bactéries sulfato-réductrices identifiées parmi les Deltaproteobacteria et les Firmicutes). La diversité des eucaryotes est quant à elle dominée par les Chlorophyta (plus particulièrement un phylotype d'Ulvophyceae unicellulaire), les straménopiles (plus particulièrement les diatomées), les alveolés (plus particulièrement les ciliés) et les champignons (Fungi).

En se basant sur les métabolismes connus de représentants cultivés des groupes en question et sur les effets connus de ces métabolismes sur la précipitation/dissolution des carbonates, on peut proposer le modèle suivant de formation : la photosynthèse oxygénique (réalisée par les cyanobactéries, les algues vertes et les diatomées) et la photosynthèse anoxygénique favorisent la précipitation des carbonates pendant le jour. Les hétérotrophes

## CONCLUSIONS

capables de dégrader les molécules organiques complexes de type EPS (Verrucomicrobia, Bacteroidetes, Planctomycetales et Fungi) favorisent de deux façons la précipitation de carbonate : (i) d'une part en libérant les cations chélatés par les EPS et en dévoilant des patrons organiques favorisant la nucléation minérale et (ii) d'autre part en produisant des petites molécules organiques qui favorisent l'activité des bactéries sulfato-réductrices. La sulfato-réduction favorise la précipitation des carbonates néanmoins sa contribution pourrait être assez faible dans les microbialites d'Alchichica étant donné que les lignées potentiellement impliquées ont été détectées de façon minoritaire. Par ailleurs l'activité des organismes endolithiques (certains Fungi et certaines Cyanobacteria) pourrait contribuer à déstabiliser la partie indurée du microbialite. C'est donc un équilibre entre les processus qui favorisent la précipitation et ceux qui favorisent la destruction du système qui contraint la croissance effective du microbialite.

### **C. Fossilisation des Pleurocapsales dans l'aragonite**

Nous avons observé une association préférentielle entre les colonies de cyanobactéries appartenant à l'ordre des Pleurocapsales et l'aragonite. Nous avons décrit le gradient de fossilisation des Pleurocapsales dans l'aragonite. Nous avons vu qu'il existe deux types d'aragonite de morphologie différente. Le premier type de texture fibreuse constitué de nano-baguettes remplit l'espace intercellulaire de la colonie de Pleurocapsales. Ce premier type est organisé en couches successives et l'orientation des baguettes est perpendiculaire à la surface des cellules de Pleurocapsales. Le second type d'aragonite localisé à l'intérieur des cellules de Pleurocapsales est formé de cristaux plus massifs présentant tous la même orientation au sein d'une même cellule. Le devenir de la matière organique lors de la fossilisation a été suivi par spectroscopie XANES. Ceci a montré qu'au début, la matière organique reste associée aux corps cellulaires, puis à la paroi des cellules uniquement, enfin elle est dispersée et sa distribution ne renseigne plus sur la distribution initiale des cellules.

Ces observations nous ont conduits à proposer un modèle séquentiel de la formation de microfossiles de Pleurocapsales dans le cas des microbialites d'Alchichica. L'alcalinité produite par la cellule en relation avec l'activité photosynthétique est exportée au niveau de la gaine. Ceci entraîne la précipitation d'une première génération d'aragonite qui nucléée à partir de la surface des cellules sous forme de nano-baguettes. La texture de cette première génération d'aragonite est sans doute contrôlée par le fait que la croissance cristalline a lieu

## CONCLUSIONS

dans un réseau dense d'EPS. La matière organique du corps cellulaire est dégradée, peut-être par des bactéries hétérotrophes, et l'espace central de la cellule est le lieu de la précipitation d'une seconde génération d'aragonite. La texture plus massive de celle-ci nous renseigne sur le fait que la croissance cristalline a eu lieu avec moins de contraintes stériques que dans le cas du premier type d'aragonite. Finalement, ce qui nous permet de reconnaître le microfossile de *Pleurocapsales* c'est le fait que la morphologie de la cellule a été préservée par la mise en place de deux générations successives d'aragonite, une extracellulaire et une intracellulaire. Ainsi la présence et la distribution de la matière organique ne sont pas, dans ce cas, des critères pertinents pour la reconnaissance de ce genre de microfossile.

### **D. Biominéralisation intracellulaire chez *Ca. Gloeomargarita lithophora***

Nous avons décrit, chez la souche que nous avons nommée *Candidatus Gloeomargarita lithophora*, la présence d'inclusions intracellulaires de carbonate de Ca-Mg-Sr-Ba. Cette souche a été décrite et enrichie à partir des biofilms associés aux microbialites d'Alchichica. Les inclusions intracellulaires sont amorphes, relativement sphériques, elles font en moyenne 270 nm de diamètre. Les inclusions représentent en moyenne 6 % du volume de la cellule et augmentent sa masse d'environ 12 % par rapport à une cellule qui ne les contiendrait pas. La mise en culture de la souche et le séquençage de son SSU rDNA a permis d'affilier cette souche à l'ordre basal de cyanobactéries des *Gloeobacterales*.

Ces observations ont mis en lumière qu'il existe un type de biominéralisation intracellulaire contrôlé chez les cyanobactéries, dont le mécanisme reste à identifier. L'existence de la biominéralisation intracellulaire chez les cyanobactéries éclaire sous un jour nouveau l'absence de calcimicrobes à l'Archéen. En effet si la biominéralisation intracellulaire est un caractère ancestral dans la lignée des cyanobactéries calcifiantes, alors les cyanobactéries n'auraient pas pu être fossilisées avant l'émergence dans la lignée de la biominéralisation extracellulaire.



## Bibliographie

- Addadi, L., S. Raz, et al.** (2003). "Taking advantage of disorder: Amorphous calcium carbonate and its roles in biomineralization." Adv. Mater. (Weinheim, Ger.) **15**(12): 959-970.
- Adl, S. M., A. G. B. Simpson, et al.** (2005). "The new higher level classification of eukaryotes with emphasis on the taxonomy of protists." J. Eukaryot. Microbiol. **52**(5): 399-451.
- AL-Thukair** (1994). "New euendolithic cyanobacteria from the bahama bank and the arabian gulf : Hyella racemus sp. nov." J. Phycol.
- Alcocer, J., A. Lugo, et al.** (2001). "Water column stratification and its implications in the tropical warm monomictic Lake Alchichica, Puebla, Mexico." Int. Ver. Theor. Angew. **27**: 3166-3169.
- Allen, M. A., F. Goh, et al.** (2009). "Bacterial, archaeal and eukaryotic diversity of smooth and pustular microbial mat communities in the hypersaline lagoon of Shark Bay." Geobiol. **7**(1): 82-96.
- Allen, M. A., B. A. Neilan, et al.** (2010). "Lipid biomarkers in Hamelin Pool microbial mats and stromatolites." Org. Geochem. **41**(11): 1207-1218.
- Allwood, A. C., M. R. Walter, et al.** (2006). "Stromatolite reef from the Early Archaean era of Australia." Nature **441**(7094): 714-718.
- Aloisi, G.** (2008). "The calcium carbonate saturation state in cyanobacterial mats throughout Earth's history." Geochim. Cosmochim. Acta **72**(24): 6037-6060.
- Altermann** (2006). "Cyanobacterial calcification and its rock-building potential during 3.5 billion years of Earth history." Geobiol.
- Altermann, W.** (2004). Precambrian Stromatolites: Problems in definition, classification, morphology and stratigraphy. Eriksson, P.G., Altermann, W., Nelson, D.R., Mueller, W. & Catuneanu, O. (Eds.): The Precambrian Earth: Tempos and Events. Developments in Precambrian Geology. Elsevier: 564-574.
- Altschul, S. F., T. L. Madden, et al.** (1997). "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs." Nucleic Acids Res. **25**(17): 3389-3402.
- Andres, M. S. and R. P. Reid** (2006a). "Growth morphologies of modern marine stromatolites: A case study from Highborne Cay, Bahamas." Sediment. Geol. **185**(3-4): 319-328.
- Andres, M. S., D. Y. Sumner, et al.** (2006b). "Isotopic fingerprints of microbial respiration in aragonite from Bahamian stromatolites." Geology **34**(11): 973-976.
- Armienta, M. A., G. Vilaclara, et al.** (2008). "Water chemistry of lakes related to active and inactive Mexican volcanoes." J. Volcanol. Geotherm. Res. **178**(2): 249-258.

## BIBLIOGRAPHIE

- Arndt, N. T., D. R. Nelson, et al.** (1991). "The Age of the Fortescue Group, Hamersley Basin, Western-Australia, from Ion Microprobe Zircon U-Pb Results." Australian Journal of Earth Sciences **38**(3): 261-281.
- Arp, G., A. Reimer, et al.** (1999a). "Calcification in cyanobacterial biofilms of alkaline salt lakes." Eur. J. Phycol. **34**(4): 393-403.
- Arp, G., A. Reimer, et al.** (2001). "Photosynthesis-induced biofilm calcification and calcium concentrations in phanerozoic oceans." Science **292**(5522): 1701-1704.
- Arp, G., A. Reimer, et al.** (2002). "Calcification of cyanobacterial filaments: Girvanella and the origin of lower Paleozoic lime mud: Comment and reply - Comment." Geology **30**(6): 579-580.
- Arp, G., A. Reimer, et al.** (2003). "Microbialite formation in seawater of increased alkalinity, Satonda crater lake, Indonesia." J. Sediment. Res. **73**(1): 105-127.
- Arp, G., A. Reimer, et al.** (2004). "Microbialite formation in seawater of increased alkalinity, Satonda Crater Lake, Indonesia - Reply." J. Sediment. Res. **74**(2): 318-325.
- Arp, G., V. Thiel, et al.** (1999b). "Biofilm exopolymers control microbialite formation at thermal springs discharging into the alkaline Pyramid Lake, Nevada, USA." Sediment. Geol. **126**(1-4): 159-176.
- Bartley, J. K.** (1996). "Actualistic taphonomy of cyanobacteria; implications for the Precambrian fossil record." Palaaios **11**(6): 571-586.
- Bashan, A. and A. Yonath** (2008). "Correlating ribosome function with high-resolution structures." Trends Microbiol. **16**(7): 326-335.
- Baumgartner, L. K., C. Dupraz, et al.** (2009a). "Microbial Species Richness and Metabolic Activities in Hypersaline Microbial Mats: Insight into Biosignature Formation Through Lithification." Astrobiology **9**(9): 861-874.
- Baumgartner, L. K., R. P. Reid, et al.** (2006). "Sulfate reducing bacteria in microbial mats: Changing paradigms, new discoveries." Sediment. Geol. **185**(3-4): 131-145.
- Baumgartner, L. K., J. R. Spear, et al.** (2009b). "Microbial diversity in modern marine stromatolites, Highborne Cay, Bahamas." Environ Microbiol **11**(10): 2710-2719.
- Bazylinski, D. A. and R. B. Frankel** (2003). "Biologically Controlled Mineralization in Prokaryotes." Rev. Mineral. Geochem. **54**(1): 217-247.
- Bazylinski, D. A. and R. B. Frankel** (2004). "Magnetosome formation in prokaryotes." Nat. Rev. Microbiol. **2**(3): 217-230.
- Belkin, S., R. J. Mehlhorn, et al.** (1987). "Proton Gradients in Intact Cyanobacteria." Plant Physiol. **84**(1): 25-30.
- Benzerara, K., A. Meibom, et al.** (2010). "Nanotextures of aragonite in stromatolites from the quasi-marine Satonda crater lake, Indonesia." Geological Society, London, Special Publications **336**: 211-224.
- Benzerara, K. and N. Menguy** (2009). "Looking for traces of life in minerals." CR Palevol **8**(7): 617-628.
- Benzerara, K., N. Menguy, et al.** (2006). "Nanoscale detection of organic signatures in carbonate microbialites." Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **103**(25): 9440-9445.

## BIBLIOGRAPHIE

- Benzerara, K., T. H. Yoon, et al.** (2004). "Scanning transmission X-ray microscopy study of microbial calcification." Geobiol. **2**(4): 249-259.
- Bernard, S., K. Benzerara, et al.** (2010). "Multiscale characterization of pyritized plant tissues in blueschist facies metamorphic rocks." Geochim. Cosmochim. Acta **74**(17): 5054-5068.
- Bernard, S., K. Benzerara, et al.** (2007). "Exceptional preservation of fossil plant spores in high-pressure metamorphic rocks." Earth Planet. Sci. Lett. **262**(1-2): 257-272.
- Beyssac, O., B. Goffe, et al.** (2002). "Raman spectra of carbonaceous material in metasediments: a new geothermometer." J. Metamorph. Geol. **20**(9): 859-871.
- Bluhm, H., K. Andersson, et al.** (2006). "Soft X-ray microscopy and spectroscopy at the molecular environmental science beamline at the Advanced Light Source." J. Electron Spectrosc. Relat. Phenom. **150**(2-3): 86-104.
- Bode, H. B., B. Zeggel, et al.** (2003). "Steroid biosynthesis in prokaryotes: identification of myxobacterial steroids and cloning of the first bacterial 2,3(S)-oxidosqualene cyclase from the myxobacterium *Stigmatella aurantiaca*." Mol. Microbiol. **47**(2): 471-481.
- Bosak, T., S. E. Greene, et al.** (2007). "A likely role for anoxygenic photosynthetic microbes in the formation of ancient stromatolites." Geobiol. **5**(2): 119-126.
- Brady, A. L., G. F. Slater, et al.** (2010). "Photosynthetic isotope biosignatures in laminated micro-stromatolitic and non-laminated nodules associated with modern, freshwater microbialites in Pavilion Lake, BC." Chem. Geol. **274**(1-2): 56-67.
- Braissant, O., G. Cailleau, et al.** (2003). "Bacterially induced mineralization of calcium carbonate in terrestrial environments: The role of exopolysaccharides and amino acids." J. Sediment. Res. **73**(3): 485-490.
- Braissant, O., A. W. Decho, et al.** (2007). "Exopolymeric substances of sulfate-reducing bacteria: Interactions with calcium at alkaline pH and implication for formation of carbonate minerals." Geobiol. **5**(4): 401-411.
- Braithwaite, C. J. R. and V. Zedef** (1994). "Living Hydromagnesite Stromatolites from Turkey." Sediment. Geol. **92**(1-2): 1-5.
- Braithwaite, C. J. R. and V. Zedef** (1996). "Hydromagnesite stromatolites and sediments in an alkaline lake, Salda Golu, Turkey." J. Sediment. Res. **66**(5): 991-1002.
- Brasier, M., N. McLoughlin, et al.** (2006). "A fresh look at the fossil evidence for early Archaean cellular life." Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci. **361**(1470): 887-902.
- Brasier, M. D., O. R. Green, et al.** (2002). "Questioning the evidence for Earth's oldest fossils." Nature **416**(6876): 76-81.
- Brasier, M. D., O. R. Green, et al.** (2005). "Critical testing of earth's oldest putative fossil assemblage from the similar to 3.5 Ga Apex Chert, Chinaman Creek, western Australia." Precambrian Res. **140**(1-2): 55-102.

## BIBLIOGRAPHIE

- Breitbart, M., A. Hoare, et al.** (2009). "Metagenomic and stable isotopic analyses of modern freshwater microbialites in Cuatro CiEnegas, Mexico." Environ Microbiol **11**(1): 16-34.
- Brocks, J. J., R. Buick, et al.** (2003). "A reconstruction of Archean biological diversity based on molecular fossils from the 2.78 to 2.45 billion-year-old Mount Bruce Supergroup, Hamersley Basin, Western Australia." Geochim. Cosmochim. Acta **67**(22): 4321-4335.
- Brocks, J. J., G. A. Logan, et al.** (1999). "Archean molecular fossils and the early rise of eukaryotes." Science **285**(5430): 1033-6.
- Bryant, D. A., A. M. G. Costas, et al.** (2007). "Candidatus Chloracidobacterium thermophilum: An aerobic phototrophic acidobacterium." Science **317**(5837): 523-526.
- Buick, R.** (1992). "The Antiquity of Oxygenic Photosynthesis - Evidence from Stromatolites in Sulfate-Deficient Archean Lakes." Science **255**(5040): 74-77.
- Buick, R.** (2008). "When did oxygenic photosynthesis evolve?" Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci. **363**(1504): 2731-43.
- Burne, R. V. and L. S. Moore** (1987). "Microbialites; organosedimentary deposits of benthic microbial communities " Palaaios **2**(3): 241-254.
- Burns, B. P., F. Goh, et al.** (2004). "Microbial diversity of extant stromatolites in the hypersaline marine environment of Shark Bay, Australia." Environ Microbiol **6**(10): 1096-1101.
- Butterfield, N. J.** (2000). "Bangiomorpha pubescens n. gen., n. sp.: implications for the evolution of sex, multicellularity, and the Mesoproterozoic/Neoproterozoic radiation of eukaryotes." Paleobiology **26**(3): 386-404.
- Byerly, G. R., D. R. Lower, et al.** (1986). "Stromatolites from the 3,300-3,500-Myr Swaziland Supergroup, Barberton Mountain Land, South-Africa." Nature **319**(6053): 489-491.
- Canfield, D. E. and B. Thamdrup** (2009). "Towards a consistent classification scheme for geochemical environments, or, why we wish the term 'suboxic' would go away." Geobiol. **7**(4): 385-392.
- Carignan, J., P. Hild, et al.** (2001). "Routine Analyses of Trace Elements in Geological Samples using Flow Injection and Low Pressure On-Line Liquid Chromatography Coupled to ICP-MS: A Study of Geochemical Reference Materials BR, DR-N, UB-N, AN-G and GH." Geostandards Newsletter **25**(2-3): 187-198.
- Chafetz, H. S. and C. Buczynski** (1992). "Bacterially induced lithification of microbial mats." Palaaios **7**(3): 277-293.
- Chyba, C. F.** (1993). "The Violent Environment of the Origin of Life - Progress and Uncertainties." Geochim. Cosmochim. Acta **57**(14): 3351-3358.
- Coshell, L., M. R. Rosen, et al.** (1998). "Hydromagnesite replacement of biomineralized aragonite in a new location of Holocene stromatolites, Lake Walyungup, Western Australia." Sedimentology **45**(6): 1005-1018.

## BIBLIOGRAPHIE

- Couradeau, E., K. Benzerara, et al.** (2011). "Prokaryotic and Eukaryotic Community Structure in Field and Cultured Microbialites from the Alkaline Lake Alchichica (Mexico)." PLoS One **6**(12): e28767.
- Decho, A. W., P. T. Visscher, et al.** (2005). "Production and cycling of natural microbial exopolymers (EPS) within a marine stromatolite." Palaeogeogr. Palaeoclimatol. Palaeoecol. **219**(1-2): 71-86.
- Desnues, C., B. Rodriguez-Brito, et al.** (2008). "Biodiversity and biogeography of phages in modern stromatolites and thrombolites." Nature **452**(7185): 340-U5.
- Dominguez, D. C.** (2004). "Calcium signalling in bacteria." Mol. Microbiol. **54**(2): 291-7.
- Donoghue, P. C. J. and M. J. Benton** (2007). "Rocks and clocks: calibrating the Tree of Life using fossils and molecules." Trends Ecol. Evol. **22**(8): 424-431.
- Dupraz, C., R. P. Reid, et al.** (2009). "Processes of carbonate precipitation in modern microbial mats." Earth-Sci Rev **96**(3): 141-162.
- Dupraz, C. and P. T. Visscher** (2005). "Microbial lithification in marine stromatolites and hypersaline mats." Trends Microbiol. **13**(9): 429-438.
- Dupraz, C., P. T. Visscher, et al.** (2004). "Microbe-mineral interactions: early carbonate precipitation in a hypersaline lake (Eleuthera Island, Bahamas)." Sedimentology **51**(4): 745-765.
- Edwards, K. J. and D. A. Bazylinski** (2008). "Intracellular minerals and metal deposits in prokaryotes." Geobiol. **6**(3): 309-317.
- El Albani, A., S. Bengtson, et al.** (2010). "Large colonial organisms with coordinated growth in oxygenated environments 2.1 Gyr ago." Nature **466**(7302): 100-104.
- Falcon, L. I., S. Magallon, et al.** (2010). "Dating the cyanobacterial ancestor of the chloroplast." ISME J **4**(6): 777-783.
- Farquhar, J., A. L. Zerkle, et al.** (2011). "Geological constraints on the origin of oxygenic photosynthesis." Photosynth. Res. **107**(1): 11-36.
- Foster, J. S., S. J. Green, et al.** (2009). "Molecular and morphological characterization of cyanobacterial diversity in the stromatolites of Highborne Cay, Bahamas." ISME J **3**(5): 573-587.
- Frankel, R. B. and D. A. Bazylinski** (2003). "Biologically Induced Mineralization by Bacteria." Rev. Mineral. Geochem. **54**(1): 95-114.
- Freytet, P. and E. P. Verrecchia** (1998). "Freshwater organisms that build stromatolites: a synopsis of biocrystallization by prokaryotic and eukaryotic algae." Sedimentology **45**(3): 535-563.
- Galvez, M. E., O. Beyssac, et al.** (2012). "Morphological preservation of carbonaceous plant fossils in blueschist metamorphic rocks from New Zealand." Geobiol. **10**(2): 118-129.
- Garcia-Pichel, F., F. A. Al-Horani, et al.** (2004). "Balance between microbial calcification and metazoan bioerosion in modern stromatolitic oncolites." Geobiol. **2**(1): 49-57.
- Garcia-Ruiz, J. M., A. Carnerup, et al.** (2002). "Morphology: an ambiguous indicator of biogenicity." Astrobiology **2**(3): 353-69.

## BIBLIOGRAPHIE

- Garcia-Ruiz, J. M., S. T. Hyde, et al.** (2003). "Self-assembled silica-carbonate structures and detection of ancient microfossils." *Science* **302**(5648): 1194-1197.
- Gerard, E., B. Menez, et al.** (submitted). "Combined three-dimensional Raman and molecular fluorescence imaging reveal specific carbonate-microbe interactions in modern microbialites."
- Gerard, E., D. Moreira, et al.** (2009). "Modern subsurface bacteria in pristine 2.7 Ga-old fossil stromatolite drillcore samples from the Fortescue Group, Western Australia." *PLoS One* **4**(4): e5298.
- Gischler, E., M. A. Gibson, et al.** (2008). "Giant Holocene freshwater microbialites, Laguna Bacalar, Quintana Roo, Mexico." *Sedimentology* **55**(5): 1293-1309.
- Goh, F., M. A. Allen, et al.** (2009). "Determining the specific microbial populations and their spatial distribution within the stromatolite ecosystem of Shark Bay." *ISME J* **3**(4): 383-396.
- Golubic, S. and K. M. Browne** (1996). "Schizothrix gebeleinii sp. nova builds subtidal stromatolites, Lee Stocking Island, Bahamas." *Algological Studies/Archiv für Hydrobiologie, Supplement Volumes* **83**: 273-290.
- Golubic, S. and H. J. Hofmann** (1976). "Comparison of Holocene and mid-Precambrian Entophysalidaceae (Cyanophyta) in stromatolitic algal mats; cell division and degradation." *J. Paleontol.* **50**(6): 1074-1082.
- Golubic, S., G. Radtke, et al.** (2005). "Endolithic fungi in marine ecosystems." *Trends Microbiol.* **13**(5): 229-235.
- Gould, S. J.** (1991). *Wonderful Life: The Burgess Shale and the Nature of History*, W. W. Norton & Company.
- Grotzinger, J. P. and A. H. Knoll** (1999). "Stromatolites in Precambrian carbonates: Evolutionary mileposts or environmental dipsticks?" *Annu. Rev. Earth Planet. Sci.* **27**: 313-358.
- Grotzinger, J. P. and D. H. Rothman** (1996). "An abiotic model for stromatolite morphogenesis." *Nature* **383**(6599): 423-425.
- Gupta, R. S. and D. W. Mathews** (2010). "Signature proteins for the major clades of Cyanobacteria." *BMC Evol. Biol.* **10**: -.
- Han, T. M. and B. Runnegar** (1992). "Megascopic Eukaryotic Algae from the 2.1-Billion-Year-Old Negaunee Iron-Formation, Michigan." *Science* **257**(5067): 232-235.
- Hardie, L. A.** (2003). "Secular variations in Precambrian seawater chemistry and the timing of Precambrian aragonite seas and calcite seas." *Geology* **31**(9): 785-788.
- Havemann, S. A. and J. S. Foster** (2008). "Comparative Characterization of the Microbial Diversities of an Artificial Microbialite Model and a Natural Stromatolite." *Appl. Environ. Microbiol.* **74**(23): 7410-7421.
- Hazen, R. M., D. Papineau, et al.** (2008). "Mineral evolution." *Am. Mineral.* **93**(11-12): 1693-1720.
- Heaney, P. J., E. P. Vicenzi, et al.** (2001). "Focused ion beam milling: A method of site-specific sample extraction for microanalysis of Earth and planetary materials." *Am. Mineral.* **86**(9): 1094-1099.

## BIBLIOGRAPHIE

- Hedges, S. B., J. E. Blair, et al.** (2004). "A molecular timescale of eukaryote evolution and the rise of complex multicellular life." BMC Evol. Biol. **4**.
- Hofmann, H. J., K. Grey, et al.** (1999). "Origin of 3.45 Ga coniform stromatolites in Warrawoona Group, Western Australia." Geological Society of America Bulletin **111**(8): 1256-1262.
- Hoppert, M., C. Flies, et al.** (2004). "Colonization strategies of lithobiontic microorganisms on carbonate rocks." Environ. Geol. **46**(3-4): 421-428.
- Horodyski, R. J. and S. P. Vonder Haar** (1975). "Recent calcareous stromatolites from Laguna Mormona (Baja California), Mexico." J. Sediment. Res. **45**(4): 894-906.
- Hultdgren, T., J. A. Cunningham, et al.** (2011). "Fossilized Nuclei and Germination Structures Identify Ediacaran "Animal Embryos" as Encysting Protists." Science **334**(6063): 1696-1699.
- Jaccard, P.** (1901). "Distribution de la Flore Alpine dans le Bassin des Dranses et dans quelques régions voisines." Bull. Soc. Vaud. Sci. Nat. **37**(140): 241-272.
- Jansson, C. and T. Northen** (2010). "Calcifying cyanobacteria-the potential of biomineralization for carbon capture and storage." Curr. Opin. Biotechnol. **21**(3): 365-371.
- Javaux, E. J., C. P. Marshall, et al.** (2010). "Organic-walled microfossils in 3.2-billion-year-old shallow-marine siliciclastic deposits." Nature **463**(7283): 934-U108.
- Jobb, G., A. von Haeseler, et al.** (2004). "TREEFINDER: a powerful graphical analysis environment for molecular phylogenetics." BMC Evol. Biol. **4**:18.
- Jogler, C. and D. Schuler** (2009). "Genomics, Genetics, and Cell Biology of Magnetosome Formation." Annu. Rev. Microbiol. **63**: 501-521.
- Jones, M. D. M., I. Forn, et al.** (2011). "Discovery of novel intermediate forms redefines the fungal tree of life." Nature advance online publication.
- Katoh, K., K. Misawa, et al.** (2002). "MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform." Nucleic Acids Res. **30**(14): 3059-3066.
- Kazmierczak, J. and S. Kempe** (2006). "Genuine modern analogues of Precambrian stromatolites from caldera lakes of Niuafou Island, Tonga." Naturwissenschaften **93**(3): 119-126.
- Kaźmierczak, J., S. Kempe, et al.** (2011). "Hydrochemistry and microbialites of the alkaline crater lake Alchichica, Mexico." Facies: 1-28.
- Kempe, S. and J. Kazmierczak** (1990). "Chemistry and Stromatolites of the Sea-Linked Satonda Crater Lake, Indonesia - a Recent Model for the Precambrian Sea." Chem. Geol. **81**(4): 299-310.
- Kempe, S., J. Kazmierczak, et al.** (1991). "Largest Known Microbialites Discovered in Lake Van, Turkey." Nature **349**(6310): 605-608.
- Kerr, R. A.** (2005). "Earth science - The story of O-2." Science **308**(5729): 1730-1732.
- Knoll, A. H., I. J. Fairchild, et al.** (1993). "Calcified Microbes in Neoproterozoic Carbonates - Implications for Our Understanding of the Proterozoic Cambrian Transition." Palaios **8**(6): 512-525.



## BIBLIOGRAPHIE

- Kolo, K., E. Keppens, et al.** (2007). "Experimental observations on fungal diagenesis of carbonate substrates." *J. Geophys. Res-Bioge* **112**(G1).
- Koonin, E. V. and W. Martin** (2005). "On the origin of genomes and cells within inorganic compartments." *Trends Genet.* **21**(12): 647-654.
- Krumbein, W. E. and C. Giele** (1979). "Calcification in a coccoid cyanobacterium associated with the formation of desert stromatolites." *Sedimentology* **26**(4): 593-604.
- Kump, L. R.** (2008). "The rise of atmospheric oxygen." *Nature* **451**(7176): 277-278.
- Kump, L. R. and M. E. Barley** (2007). "Increased subaerial volcanism and the rise of atmospheric oxygen 2.5 billion years ago." *Nature* **448**(7157): 1033-1036.
- Kupriyanova, E. V., M. A. Sinetova, et al.** (2011). "Extracellular [beta]-class carbonic anhydrase of the alkaliphilic cyanobacterium *Microcoleus chthonoplastes*." *J. Photoch. Photobio. B* **In Press, Corrected Proof**.
- Lara, E., D. Moreira, et al.** (2010). "The Environmental Clade LKM11 and Rozella Form the Deepest Branching Clade of Fungi." *Protist* **161**(1): 116-121.
- Last, F. M., W. M. Last, et al.** (2010). "Carbonate microbialites and hardgrounds from Manito Lake, an alkaline, hypersaline lake in the northern Great Plains of Canada." *Sediment. Geol.* **225**(1-2): 34-49.
- Laval, B., S. L. Cady, et al.** (2000). "Modern freshwater microbialite analogues for ancient dendritic reef structures." *Nature* **407**(6804): 626-629.
- Lefevre, C. T., N. Menguy, et al.** (2011). "A Cultured Greigite-Producing Magnetotactic Bacterium in a Novel Group of Sulfate-Reducing Bacteria." *Science* **334**(6063): 1720-1723.
- Lepland, A., M. A. van Zuilen, et al.** (2011). "Fluid-deposited graphite and its geobiological implications in early Archean gneiss from Akilia, Greenland." *Geobiol.* **9**(1): 2-9.
- Lepot, K., K. Benzerara, et al.** (2008). "Microbially influenced formation of 2,724-million-year-old stromatolites." *Nat. Geosci.* **1**(2): 118-121.
- Lepot, K., K. Benzerara, et al.** (2009). "Organic matter heterogeneities in 2.72 Ga stromatolites: Alteration versus preservation by sulfur incorporation." *Geochim. Cosmochim. Acta* **73**(21): 6579-6599.
- Leveille, R. J., W. S. Fyfe, et al.** (2000). "Geomicrobiology of carbonate-silicate microbialites from Hawaiian basaltic sea caves." *Chem. Geol.* **169**(3-4): 339-355.
- Leveille, R. J., F. J. Longstaffe, et al.** (2002). "Kerolite in carbonate-rich speleothems and microbial deposits from basaltic caves, Kauai, Hawaii." *Clays Clay Miner.* **50**(4): 514-524.
- Ley, R. E., J. K. Harris, et al.** (2006). "Unexpected diversity and complexity of the Guerrero Negro hypersaline microbial mat." *Appl. Environ. Microbiol.* **72**(5): 3685-3695.
- Lindsay, J. F., M. D. Brasier, et al.** (2005). "The problem of deep carbon - An Archean paradox." *Precambrian Res.* **143**(1-4): 1-22.

## BIBLIOGRAPHIE

- Logan, B. W.** (1961). "CRYPTOZOON AND ASSOCIATE STROMATOLITES FROM THE RECENT, SHARK BAY, WESTERN-AUSTRALIA." J. Geol. **69**(5): 517-&.
- Lopez-Garcia, P., J. Kazmierczak, et al.** (2005). "Bacterial diversity and carbonate precipitation in the giant microbialites from the highly alkaline Lake Van, Turkey." Extremophiles **9**(4): 263-274.
- Lopez-Garcia, P. and D. Moreira** (2008). "Tracking microbial biodiversity through molecular and genomic ecology." Res. Microbiol. **159**(1): 67-73.
- Lopez-Garcia, P., D. Moreira, et al.** (2006). "Ancient Fossil Record and Early Evolution (ca. 3.8 to 0.5 Ga)." Earth, Moon, and Planets **98**(1-4): 247-290.
- Lowe, D. R.** (1980). "Stromatolites 3,400-Myr old from the Archean of Western Australia." Nature **284**(5755): 441-443.
- Lowe, D. R.** (1994). "Abiological origin of described stromatolites older than 3.2 Ga." Geology **22**: 387-90.
- Lowenstam, H. A.** (1981). "Minerals formed by organisms." Science **211**(4487): 1126-1131.
- Macek, M., D. Pestova, et al.** (2008). "Seasonal and spatial dynamics of a ciliate assemblage in a warm-monomictic Lake Alchichica (Puebla, Mexico)." Hidrobiologica **18**(1): 25-35.
- Macintyre, I. G., L. Prufert-Bebout, et al.** (2000). "The role of endolithic cyanobacteria in the formation of lithified laminae in Bahamian stromatolites." Sedimentology **47**(5): 915-921.
- Madigan, M., J. Martinko, et al.** (2009). Brock Biology of Microorganisms, 12th ed. San Francisco, Pearson International Edition.
- Marshall, C. P., J. R. Emry, et al.** (2011). "Haematite pseudomicrofossils present in the 3.5-billion-year-old Apex Chert." Nat. Geosci. **4**(4): 240-243.
- McLoughlin, N., L. A. Wilson, et al.** (2008). "Growth of synthetic stromatolites and wrinkle structures in the absence of microbes - implications for the early fossil record." Geobiol. **6**(2): 95-105.
- Merz-Preiss, M.** (2000). Calcification in cyanobacteria. Microbial Sediments. R. Riding and S. M. Awramik. Berlin, Springer-Verlag: 50-56.
- Merz-Preiss, M. and R. Riding** (1999). "Cyanobacterial tufa calcification in two freshwater streams: ambient environment, chemical thresholds and biological processes." Sediment. Geol. **126**(1-4): 103-124.
- Miot, J., K. Maclellan, et al.** (2011). "Preservation of protein globules and peptidoglycan in the mineralized cell wall of nitrate-reducing, iron(II)-oxidizing bacteria: a cryo-electron microscopy study." Geobiol. **9**(6): 459-470.
- Mobberley, J. M., M. C. Ortega, et al.** (2011). "Comparative microbial diversity analyses of modern marine thrombolitic mats by barcoded pyrosequencing." Environ Microbiol. no-no.
- Mojzsis, S. J., G. Arrhenius, et al.** (1996). "Evidence for life on Earth before 3,800 million years ago." Nature **384**(6604): 55-59.

## BIBLIOGRAPHIE

- Moons, P., C. W. Michiels, et al.** (2009). "Bacterial interactions in biofilms." Crit. Rev. Microbiol. **35**(3): 157-168.
- Moore, L. S.** (1987). "Water chemistry of the coastal saline lakes of the Clifton-Preston Lakeland system, south-western Australia, and its influence on stromatolite formation." Mar. Freshw. Res. **38**(5): 647-660.
- Moran, A. L.** (2000). "Calcein as a marker in experimental studies newly-hatched gastropods." Mar. Biol. **137**(5-6): 893-898.
- Muyzer, G. and A. J. M. Stams** (2008). "The ecology and biotechnology of sulphate-reducing bacteria." Nat. Rev. Microbiol. **6**(6): 441-454.
- Myshrall, K. L., J. M. Mobberley, et al.** (2010). "Biogeochemical cycling and microbial diversity in the thrombolitic microbialites of Highborne Cay, Bahamas." Geobiol. **8**(4): 337-354.
- Nagy, B., J. E. Zumberge, et al.** (1975). "Abiotic, Graphitic Microstructures in Micaceous Metaquartzite about 3760 Million Years Old from Southwestern Greenland: Implications for Early Precambrian Microfossils." Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **72**(3): 1206-9.
- Obst, M., J. J. Dynes, et al.** (2009). "Precipitation of amorphous CaCO<sub>3</sub> (aragonite-like) by cyanobacteria: A STXM study of the influence of EPS on the nucleation process." Geochim. Cosmochim. Acta **73**(14): 4180-4198.
- Osborne, R. H., G. R. Licari, et al.** (1982). "MODERN LACUSTRINE STROMATOLITES, WALKER LAKE, NEVADA." Sediment. Geol. **32**(1-2): 39-61.
- Paabo, S., H. Poinar, et al.** (2004). "Genetic analyses from ancient DNA." Annu. Rev. Genet. **38**: 645-679.
- Pace, N. R.** (1997). "A molecular view of microbial diversity and the biosphere." Science **276**(5313): 734-740.
- Panieri, G., S. Lugli, et al.** (2010). "Ribosomal RNA gene fragments from fossilized cyanobacteria identified in primary gypsum from the late Miocene, Italy." Geobiol. **8**(2): 101-111.
- Papineau, D., J. J. Walker, et al.** (2005). "Composition and structure of microbial communities from stromatolites of Hamelin Pool in Shark Bay, Western Australia." Appl. Environ. Microbiol. **71**(8): 4822-4832.
- Pentecost, A. and U. Franke** (2010). "Photosynthesis and calcification of the stromatolitic freshwater cyanobacterium Rivularia." Eur. J. Phycol. **45**(4): 345-353.
- Petryshyn, V. A. and F. A. Corsetti** (2011). "Analysis of growth directions of columnar stromatolites from Walker Lake, western Nevada." Geobiol. **9**(5): 425-435.
- Philippe, H.** (1993). "MUST, a computer package of management utilities for sequences and trees." Nucleic Acids Res. **21**(22): 5264-5272.
- Planavsky, N., R. P. Reid, et al.** (2009). "Formation and diagenesis of modern marine calcified cyanobacteria." Geobiol. **7**(5): 566-576.

## BIBLIOGRAPHIE

- Politi, Y., R. A. Metzler, et al.** (2008). "Transformation mechanism of amorphous calcium carbonate into calcite in the sea urchin larval spicule (vol 105, pg 17362, 2008)." *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**(50): 20045-20045.
- Pomar, L. and P. Hallock** (2008). "Carbonate factories: A conundrum in sedimentary geology." *Earth-Sci Rev* **87**(3-4): 134-169.
- Pouget, E. M., P. H. H. Bomans, et al.** (2009). "The Initial Stages of Template-Controlled CaCO<sub>3</sub> Formation Revealed by Cryo-TEM." *Science* **323**(5920): 1455-1458.
- Power, I. M., S. A. Wilson, et al.** (2011). "Modern carbonate microbialites from an asbestos open pit pond, Yukon, Canada." *Geobiol.* **9**(2): 180-195.
- Pratt, B. R.** (2001). "Calcification of cyanobacterial filaments: Girvanella and the origin of lower Paleozoic lime mud." *Geology* **29**(9): 763-766.
- Pratt, B. R.** (2002). "Calcification of cyanobacterial filaments: Girvanella and the origin of lower Paleozoic lime mud: Reply." *Geology* **30**(6): 580-580.
- Pronina, N., E. Kupriyanova, et al.** (2007). "Extracellular carbonic anhydrases of the stromatolite-forming cyanobacterium *Microcoleus chthonoplastes*." *Microbiology-Sgm* **153**: 1149-1156.
- Rambaut, A.** (2009). FIGTREE <http://tree.bio.ed.ac.uk/>.
- Ramirez-Reinat, E. L. and F. Garcia-Pichel** (2012). "Prevalence of Ca<sup>2+</sup>-ATPase-Mediated Carbonate Dissolution among Cyanobacterial Euendoliths." *Appl. Environ. Microbiol.* **78**(1): 7-13.
- Rappe, M. S. and S. J. Giovannoni** (2003). "The uncultured microbial majority." *Annu. Rev. Microbiol.* **57**: 369-394.
- Rashby, S. E., A. L. Sessions, et al.** (2007). "Biosynthesis of 2-methylbacteriohopanepolyols by an anoxygenic phototroph." *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**(38): 15099-15104.
- Rasmussen, B., I. R. Fletcher, et al.** (2008). "Reassessing the first appearance of eukaryotes and cyanobacteria." *Nature* **455**(7216): 1101-4.
- Raymond, J. and D. Segre** (2006). "The effect of oxygen on biochemical networks and the evolution of complex life." *Science* **311**(5768): 1764-1767.
- Reid, R. P., N. P. James, et al.** (2003). "Shark Bay stromatolites: Microfabrics and reinterpretation of origins." *Facies* **49**: 299-324.
- Reid, R. P. and I. G. MacIntyre** (2000a). "Microboring versus recrystallization: Further insight into the micritization process." *J. Sediment. Res.* **70**(1): 24-28.
- Reid, R. P., P. T. Visscher, et al.** (2000b). "The role of microbes in accretion, lamination and early lithification of modern marine stromatolites." *Nature* **406**(6799): 989-992.
- Riding, R.** (1982). "Cyanophyte calcification and changes in ocean chemistry." *Nature* **299**(5886): 814-815.
- Riding, R.** (1999). "The term stromatolite: towards an essential definition." *Lethaia* **32**(4): 321-330.
- Riding, R.** (2000). "Microbial carbonates: the geological record of calcified bacterial-algal mats and biofilms." *Sedimentology* **47**: 179-214.

## BIBLIOGRAPHIE

- Riding, R.** (2006a). "Cyanobacterial calcification, carbon dioxide concentrating mechanisms, and Proterozoic–Cambrian changes in atmospheric composition." Geobiol. **4**.
- Riding, R.** (2006b). "Microbial carbonate abundance compared with fluctuations in metazoan diversity over geological time." Sediment. Geol. **185**(3-4): 229-238.
- Riding, R., S. M. Awramik, et al.** (1991). "Bahamian Giant Stromatolites - Microbial Composition of Surface Mats." Geol. Mag. **128**(3): 227-234.
- Rieger, D, et al.** (1986). Electronic structure of the CaF[2]/Si(111) interface. Woodbury, NY, ETATS-UNIS, American Physical Society.
- Rippka, R.** (1988). "Recognition and Identification of Cyanobacteria." Methods Enzymol. **167**: 28-67.
- Sanchez-Navas, A., A. Martin-Algarra, et al.** (1998). "Bacterially-mediated authigenesis of clays in phosphate stromatolites." Sedimentology **45**(3): 519-533.
- Santos, F., A. Pena, et al.** (2010). "Bacterial diversity in dry modern freshwater stromatolites from Ruidera Pools Natural Park, Spain." Syst. Appl. Microbiol. **33**(4): 209-221.
- Schidlowski, M.** (2001). "Carbon isotopes as biogeochemical recorders of life over 3.8 Ga of Earth history: evolution of a concept." Precambrian Res. **106**(1-2): 117-134.
- Schloss, P. D. and J. Handelsman** (2005). "Introducing DOTUR, a computer program for defining operational taxonomic units and estimating species richness." Appl. Environ. Microbiol. **71**(3): 1501-1506.
- Schopf, J. W.** (1993). "Microfossils of the Early Archean Apex Chert - New Evidence of the Antiquity of Life." Science **260**(5108): 640-646.
- Schopf, J. W. and A. B. Kudryavtsev** (2011). "Biogenicity of Apex Chert microstructures." Nat. Geosci. **4**(6): 346-347.
- Schopf, J. W., A. B. Kudryavtsev, et al.** (2002). "Laser-Raman imagery of Earth's earliest fossils." Nature **416**(6876): 73-76.
- Schopf, J. W., A. B. Kudryavtsev, et al.** (2010). "Precambrian microbe-like pseudofossils: A promising solution to the problem." Precambrian Res. **179**(1-4): 191-205.
- Schopf, J. W. and B. M. Packer** (1987). "Early Archean (3.3-Billion to 3.5-Billion-Year-Old) Microfossils from Warrawoona Group, Australia." Science **237**(4810): 70-73.
- Sievert, S. M., R. P. Kiene, et al.** (2007). "The Sulfur Cycle." Oceanography **20**(2): 117-123.
- Souza-Egipsy, V., A. G. Del Cura, et al.** (2006). "Interaction between calcite and phosphorus in biomineralization processes in tufa carbonates." Int. Rev. Hydrobiol. **91**(3): 222-241.
- Spadafora, A., E. Perri, et al.** (2010). "Microbial biomineralization processes forming modern Ca:Mg carbonate stromatolites." Sedimentology **57**(1): 27-40.
- Sprachta, S., G. Camoin, et al.** (2001). "Microbialites in a modern lagoonal environment: nature and distribution, Tikehau atoll (French Polynesia)." Palaeogeogr. Palaeoclimatol. Palaeoecol. **175**(1-4): 103-124.

## BIBLIOGRAPHIE

- Stolz, J. F., T. N. Feinstein, et al.** (2001). "TEM analysis of microbial mediated sedimentation and lithification in modern marine stromatolites." Am. Mineral. **86**(7-8): 826-833.
- Strother, P. K., L. Battison, et al.** (2011). "Earth's earliest non-marine eukaryotes." Nature **473**(7348): 505-509.
- Summons, R. E., L. L. Jahnke, et al.** (1999). "2-Methylhopanoids as biomarkers for cyanobacterial oxygenic photosynthesis." Nature **400**(6744): 554-7.
- Takashima, C., T. Okumura, et al.** (2011). Microbial Control on Lamina Formation in a Travertine of Crystal Geyser, Utah. Advances in Stromatolite Geobiology. J. Reitner, N.-V. Quéric and G. Arp, Springer Berlin / Heidelberg. **131**: 123-133.
- Thomazo, C., D. L. Pinti, et al.** (2009). "Biological activity and the Earth's surface evolution: Insights from carbon, sulfur, nitrogen and iron stable isotopes in the rock record." CR Palevol **8**(7): 665-678.
- Thompson, J. B. and F. G. Ferris** (1990). "Cyanobacterial Precipitation of Gypsum, Calcite, and Magnesite from Natural Alkaline Lake Water." Geology **18**(10): 995-998.
- Vali, H. and J. L. Kirschvink** (1989). "Magnetofossil Dissolution in a Paleomagnetically Unstable Deep-Sea Sediment." Nature **339**(6221): 203-206.
- Van der Grinten, E., A. P. H. M. Janssen, et al.** (2005). "Temperature- and light-dependent performance of the cyanobacterium *Leptolyngbya foveolarum* and the diatom *Nitzschia perminuta* in mixed biofilms." Hydrobiologia **548**: 267-278.
- Van Zuilen, M. A., A. Lepland, et al.** (2003). "Graphite and carbonates in the 3.8 Ga old Isua Supracrustal Belt, southern West Greenland." Precambrian Res. **126**(3-4): 331-348.
- Visscher, P. T., R. P. Reid, et al.** (2000). "Microscale observations of sulfate reduction: Correlation of microbial activity with lithified micritic laminae in modern marine stromatolites." Geology **28**(10): 919-922.
- Visscher, P. T., R. P. Reid, et al.** (1998). "Formation of lithified micritic laminae in modern marine stromatolites (Bahamas): The role of sulfur cycling." Am. Mineral. **83**(11-12): 1482-1493.
- Visscher, P. T. and H. Vangemerden** (1991). "Production and Consumption of Dimethylsulfoniopropionate in Marine Microbial Mats." Appl. Environ. Microbiol. **57**(11): 3237-3242.
- Wacey, D., D. Gleeson, et al.** (2010). "Microbialite taphonomy and biogenicity: new insights from NanoSIMS." Geobiol. **8**(5): 403-416.
- Wacey, D., M. R. Kilburn, et al.** (2011). "Microfossils of sulphur-metabolizing cells in 3.4-billion-year-old rocks of Western Australia." Nat. Geosci. **4**(10): 698-702.
- Walker, G., R. G. Dorrell, et al.** (2011). "Eukaryotic systematics: a user's guide for cell biologists and parasitologists." Parasitology **138**(13): 1638-1663.
- Walter, M. R., R. Buick, et al.** (1980). "Stromatolites 3,400-3,500 Myr old from the North Pole area, Western Australia." Nature **284**(5755): 443-445.

## BIBLIOGRAPHIE

- Waterbury, J. B. and R. Y. Stanier** (1978). "Patterns of growth and development in pleurocapsalean cyanobacteria." Microbiol Rev **42**(1): 2-44.
- Weiner, S. and P. M. Dove** (2003). "An Overview of Biomineralization Processes and the Problem of the Vital Effect." Rev. Mineral. Geochem. **54**(1): 1-29.
- Willerslev, E. and A. Cooper** (2005). "Ancient DNA." Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences **272**(1558): 3-16.
- Winsborough, B. M. and S. Golubic** (1987). "The Role of Diatoms in Stromatolite Growth - 2 Examples from Modern Fresh-Water Settings." J. Phycol. **23**(1): 195-201.
- Woese, C. R.** (1987). "Bacterial Evolution." Microbiological Reviews **51**(2): 221-271.
- Woese, C. R., O. Kandler, et al.** (1990). "Towards a Natural System of Organisms - Proposal for the Domains Archaea, Bacteria, and Eucarya." Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **87**(12): 4576-4579.
- Woese, C. R., L. J. Magrum, et al.** (1978). "Archaeobacteria." J. Mol. Evol. **11**(3): 245-252.
- Wolfstein, K. and L. J. Stal** (2002). "Production of extracellular polymeric substances (EPS) by benthic diatoms: effect of irradiance and temperature." Marine Ecology-Progress Series **236**: 13-22.
- Yang, H. X., H. J. Sun, et al.** (2011). "Hazenite,  $\text{KNaMg}_2(\text{PO}_4)_2 \cdot 14\text{H}_2\text{O}$ , a new biologically related phosphate mineral, from Mono Lake, California, USA." Am. Mineral. **96**(4): 675-681.
- Zablen, L. B., M. S. Kissil, et al.** (1975). "Phylogenetic origin of the chloroplast and prokaryotic nature of its ribosomal RNA." Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **72**(6): 2418-22.



## ANNEXES

### Annexe 1 : Composition du milieu 539 – BG11 (Fiche collection Institut Pasteur)

Sodium nitrate	1.5 g	(Merck 106537)
Di-potassium hydrogenophosphate trihydrate	0.04 g	(Merck 105099)
Magnesium sulfate heptahydrate	0.075 g	(Merck 105886)
Calcium chloride dihydrate	0.036 g	(Merck 102382)
Ammonium iron(III) citrate/Citric acid monohydrate solution - AS00005*	5 ml	
Magnesium titriplex dihydrate solution - AS00006**	5 ml	
Sodium carbonate	0.04 g	(Merck 106392)
Trace metal "A5 + Co" - AS00008***	1 ml	
Distilled water make up to	1000 ml	

Autoclave at 120°C for 20 minutes.

#### \*Ammonium iron(III) citrate/Citric acid monohydrate solution - AS00005

Ammonium iron(III) citrate 300 mg (Merck 103761)
Citric acid monohydrate 300 mg (Merck 100244)
Distilled water make up to 250 ml

Weigh the quantity indicated of each product and dissolve separately the products in 75 ml of sterile water. Mix the solutions and adjust to final volume. Conservation 10 days in darkness.

#### \*\*Magnesium titriplex dihydrate solution - AS00006

Magnesium titriplex dihydrate 0.1 g (Merck 108409)
Distilled water make up to 500 ml

Keep 3 months at 4°C.

#### \*\*\*Trace metal "A5 + Co" - AS00008

Boric acid	2.86 g	(Merck 100165)
Manganese chloride tetrahydrate	1.81 g	(Merck 105927)
Zinc sulfate heptahydrate	0.222 g	(Merck 108883)
Sodium molybdate dihydrate	0.39 g	(Merck 106521)
Copper(II) sulfate pentahydrate	0.079 g	(Merck 102790)
Cobalt(II) nitrate hexahydrate	0.049 g	(Merck 102554)
Distilled water make up to	1000 ml	

Dissolve each component in a small volume of sterile water.

Mix the solutions in the order indicated.

Keep 6 months at 4°C.

# ANNEXES

## Annexe 2 : Protocole d'amplification PCR pour la création de banque de clone et la vérification de la présence d'insert avant séquençage

PCR pour clonage				PCR Test insert			
	Pour 1 tube	Pour 5 tubes	Pour 7 tubes		Pour 1 tube	Pour 50 tubes	
MasterMix	20	100	140	MasterMix	20	1000	
Primer-F (20µM)	0,5	2,5	3,5	Primer-F (100µM) T7 10pmol	0,1	5	
Primer-R (20µM)	0,5	2,5	3,5	Primer-R M13R (100µM) 10pmol	0,1	5	
GoTaq (5U/µl)	0,2	1	1,4	GoTaq (5U/µl)	0,1	5	
ADN	0,5µL			ADN (lysate cellulaire)	5		
Programme	55-35			Programme	55-35		
	94°C	2min			94°C	2min	
	94°C	15s			94°C	15s	
	55°C	30s	x 35 cycles		55°C	30s	x 35 cycles
	72°C	2min			72°C	2min	
	72°C	7min			72°C	7min	
	10°C	∞			10°C	∞	
	→	end			→	end	
Amorces	1B (bact)	F	B-27F	Amorces	plasmide	F	T7
		R	1492R		Topo TA	R	M13R
	1C (cyanoB)	F	Cya 106F				
		R	23S30R				
	1A (Archae)	F	21FQ				
		R	1492R				
	2A (Archae)	F	Ar109				
		R	1492R				
	3A (Archae)	F	w36				
		R	1492R				
	4A (Archae)	F	AMNEF				
		R	1492R				
	5E (Euk)	F	82F				
		R	UNonMet				

# ANNEXES

## Annexe 3 : Protocole d'amplification PCR avant migration DGGE

PCR DGGE - Bactéries				PCR DGGE – Eucaryotes			
	<b>Pour 1 tube</b>	Pour 10 tubes			<b>Pour 1 tube</b>	Pour 10 tubes	
Eau	<b>19</b>	190		Eau	<b>19</b>	190	
Buffer 10x (TaqPlat)	<b>2,5</b>	25		Buffer 10x (TaqPlat)	<b>2,5</b>	25	
dNTP (200µM)	<b>0,5</b>	5		dNTP (200µM)	<b>0,5</b>	5	
MgCl2 (50mM)	<b>1,5</b>	15		MgCl2 (50mM)	<b>1,5</b>	15	
Primer-F (10µM) 341F-GC	<b>0,75</b>	7,5	<b>3mM final</b>	Primer-F (10µM) 1209F-GC	<b>0,75</b>	7,5	<b>1,5mM final</b>
Primer-R (10µM) 534 R	<b>0,75</b>	7,5		Primer-R (10µM) 1520 R	<b>0,75</b>	7,5	
GoTaq (5U/µl)	<b>0,125</b>	1,25		GoTaq (5U/µl)	<b>0,125</b>	1,25	
ADN (lysate cellulaire)	<b>2,5 PCR direct / 1+1µL PCR nichée</b>			ADN (lysate cellulaire)	<b>1,5 PCR direct</b>		
Programme	< >	TD655550		Programme	< >	TD655550	
	94°C	3min			94°C	3min	
	94°C	15s	Touch		94°C	15s	Touch
	65°C > 55°C	30s	Down 10 cycles (65°C > 55°C)		65°C > 55°C	30s	Down 10 cycles (65°C > 55°C)
	72°C	1min30			72°C	1min30	
	94°C	15s	20 cycles à 55°C		94°C	15s	20 cycles à 55°C
	55°C	30s			55°C	30s	
	72°C	1min30			72°C	1min30	
	72°C	1h			72°C	1h	
	10°C	∞			10°C	∞	
	→	end			→	end	
Amorces	<b>16S (193pdb)</b>	F	341F-GC	Amorces	<b>18S (311pdb)</b>	F	1209F-GC
		R	534R			R	1520R

# ANNEXES

## Annexe 4 : Résumé des données issues du clonage du SSU rDNA des bactéries avec des amorces générales de bactéries (1B) et ciblant les cyanobactéries (1C)

OTU ID	Reference sequence	Taxonomy		Clonage 1B Nombre de clones par banque					Clonage 1C Nombre de clones par banque					total	BLAST  First Hit Accession number
		Phylum	Order	AQ1	AQ2	AL31	AL67	AL52	AQ1	AQ2	AL31	AL67	AL52		
Cyano_OTU123	Contig AL31_1B_2_139	Cyanobacteria	Gloeobacterales	1	0	11	5	0	9	0	3	1	0	30	EF205557
Cyano_OTU4	Contig AQ2_1C_1_38	Cyanobacteria	Oscillatoriales	0	0	0	0	0	0	6	0	0	0	6	EF205455
Cyano_OTU5	Contig AL52_1C_1_07	Cyanobacteria	Prochlorales	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	2	DQ269094
Cyano_OTU6	Contig AL64_1B_1_03	Cyanobacteria	Oscillatoriales	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	FJ425596
Cyano_OTU7	Contig AQ1_1B_2_46	Cyanobacteria	Acaryochlorales	3	0	0	0	0	3	0	0	0	1	7	AM710386
Cyano_OTU8	Contig AQ1_1B_2_148	Cyanobacteria	Oscillatoriales	2	0	0	0	0	8	18	0	0	0	28	FJ902632
Cyano_OTU9	Contig AL52_1C_1_14	Cyanobacteria	Acaryochlorales	0	0	0	0	4	0	0	0	0	9	13	DQ917811
Cyano_OTU10	Contig AQ1_1C_1_09	Cyanobacteria	Oscillatoriales	0	0	0	0	0	2	4	0	0	0	6	EU753633
Cyano_OTU11	Contig AQ2_1C_1_39	Cyanobacteria	Oscillatoriales	0	0	0	0	0	0	5	0	0	0	5	AJ007374
Cyano_OTU12	Contig AL52_1B_2_11	Cyanobacteria	Oscillatoriales	0	0	0	0	1	3	1	0	0	3	8	EF429296
Cyano_OTU13	Contig AL33_1B_1_32	Cyanobacteria	Oscillatoriales	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	2	AB257773
Cyano_OTU14	Contig AQ2_1C_1_15	Cyanobacteria	Oscillatoriales	1	0	0	0	0	3	27	0	0	0	31	AB257773
Cyano_OTU15	Contig AL52_1B_2_115	Cyanobacteria	Pleurocapsales	0	0	0	0	4	0	0	0	0	1	5	DQ293994
Cyano_OTU16	Contig AL52_1B_1_42	Cyanobacteria	Pleurocapsales	0	0	0	0	7	0	0	0	0	5	12	DQ293994
Cyano_OTU17	Contig AL52_1B_2_148	Cyanobacteria	Pleurocapsales	1	0	5	0	52	20	0	5	1	71	155	DQ302417
Cyano_OTU18	Contig AL52_1C_1_26	Cyanobacteria	Pleurocapsales	0	0	0	0	2	2	1	0	0	1	6	AY642585
Cyano_OTU19	Contig AQ2_1C_1_56	Cyanobacteria	Pleurocapsales	0	2	0	0	0	0	2	0	0	1	5	CP001287
Cyano_OTU20	Contig AQ2_1C_2_41	Cyanobacteria	Pleurocapsales	0	0	0	0	0	0	3	1	0	0	4	EF545627
Cyano_OTU21	Contig AQ1_1B_2_125	Cyanobacteria	Chroococcales	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	2	CP001287
Cyano_OTU22	Contig AQ1_1B_2_123	Cyanobacteria	Oscillatoriales	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	AF445707
Cyano_OTU23	Contig AQ2_1C_2_40	Cyanobacteria	Chroococcales	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	AB058249

# ANNEXES

Cyano_OTU24	Contig AQ1_1C_1_12	Cyanobacteria	Chroococcales	0	1	0	0	3	4	6	0	0	4	18	AF132773	
Cyano_OTU25	Contig AQ2_1C_1_10	Cyanobacteria	Chroococcales	0	9	0	0	0	0	5	0	0	0	14	FJ589716	
Cyano_OTU26	Contig AQ1_1C_2_16	Cyanobacteria	Nostocales	0	0	0	0	0	4	3	0	0	0	7	AB325906	
Cyano_OTU27	Contig AQ1_1B_1_25	Cyanobacteria	Nostocales	1	0	0	0	0	0	1	0	2	0	4	AM230673	
Cyano_OTU28	Contig AQ1_1B_2_30	Cyanobacteria	Oscillatoriales	2	1	0	0	0	2	5	0	0	0	10	DQ786167	
Cyano_OTU29	Contig AL70_1C_1_01	Cyanobacteria	Oscillatoriales	0	2	0	0	0	0	22	0	0	0	24	EU255706	
Cyano_OTU30	Contig AQ1_1B_1_17	Cyanobacteria	Oscillatoriales	10	0	0	0	0	32	1	0	0	0	43	EU255706	
Cyano_OTU31	Contig AL67_1B_2_202	Cyanobacteria	Oscillatoriales	2	0	6	7	0	2	0	6	5	1	29	AJ639893	
Cyano_OTU32	Contig AL31_1B_2_194	Cyanobacteria	Oscillatoriales	14	0	28	33	0	31	1	10	29	0	146	DQ393278	
Cyano_OTU33	Contig AL33_1B_1_03	Cyanobacteria	Oscillatoriales	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	EF654067	
Cyano_OTU34	Contig AL31_1B_2_140	Cyanobacteria	Oscillatoriales	0	0	40	29	3	0	0	36	24	1	133	AY493589	
Cyano_OTU35	Contig AQ1_1B_1_84	Cyanobacteria	Gloeobacterales	9	8	0	0	0	0	0	0	0	0	17	AF132773	
Cyano_OTU36	Contig AQ1_1C_1_35	Cyanobacteria	Gloeobacterales	11	5	1	0	0	30	33	0	0	0	80	AF132773	
Chlorop_OTU1	Contig AL31_1B_2_20	Chloroplastes	Chloroplaste	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	2	AB491827	
Chlorop_OTU2	Contig AL31_1B_2_119	Chloroplastes	Chloroplaste	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	FJ516796	
Chlorop_OTU3	Contig AQ1_1B_2_164	Chloroplastes	Chloroplaste	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0	3	FJ002157	
Chlorop_OTU4	Contig AQ1_1B_1_02	Chloroplastes	Chloroplaste	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6	FJ002224	
Alpha_OTU01	Contig AL31_1B_2_13	Alpha-proteobacteria		3	0	10	0	0							13	FM242433
Alpha_OTU02	Contig AI52_1B_2_100	Alpha-proteobacteria		9	0	4	13	2							28	FM242433
Alpha_OTU03	Contig AQ1_1B_1_74	Alpha-proteobacteria		1	0	0	0	0							1	AY555804
Alpha_OTU04	Contig AL67_1B_2_138	Alpha-proteobacteria		0	0	0	1	0							1	FM873449
Alpha_OTU05	Contig AL52_1B_2_74	Alpha-proteobacteria		0	0	0	0	1							1	DQ413135
Alpha_OTU06	Contig AQ1_1B_2_72	Alpha-proteobacteria		1	0	0	0	0							1	FM253627
Alpha_OTU07	Contig AL67_1B_2_60	Alpha-proteobacteria		0	0	0	1	0							1	FM253627
Alpha_OTU08	Contig AQ1_1B_2_194	Alpha-proteobacteria		3	0	0	0	0							3	DQ130024
Alpha_OTU09	Contig AL67_1B_2_62	Alpha-proteobacteria		0	0	0	1	0							1	EF133556

# ANNEXES

Alpha_OTU11	Contig AQ2_1B_1_04	Alpha-proteobacteria		0	1	0	0	0	1	EU861921
Alpha_OTU12	Contig AQ1_1B_2_152	Alpha-proteobacteria		0	2	0	0	0	2	AY795769
Alpha_OTU13	Contig AL52_1B_1_01	Alpha-proteobacteria		0	0	0	0	1	1	FJ205185
Alpha_OTU14	Contig AQ1_1B_1_30	Alpha-proteobacteria		1	0	2	0	1	4	FJ516937
Alpha_OTU15	Contig AQ1_1B_2_06	Alpha-proteobacteria		5	0	0	0	0	5	DQ413127
Alpha_OTU16	Contig AQ1_1B_2_31	Alpha-proteobacteria		8	0	1	0	2	11	EF208679
Alpha_OTU17	Contig AL52_1B_2_67	Alpha-proteobacteria		0	0	0	0	1	1	AJ890098
Alpha_OTU18	Contig AQ1_1B_2_12	Alpha-proteobacteria		1	0	0	0	0	1	EU440692
Alpha_OTU19	Contig AQ1_1B_2_17	Alpha-proteobacteria		1	0	0	0	0	1	EU592393
Alpha_OTU20	Contig AQ1_1B_2_102	Alpha-proteobacteria		1	0	0	2	0	3	AY945873
Alpha_OTU21	Contig AQ2_1B_1_39	Alpha-proteobacteria		0	1	0	0	0	1	FJ535474
Alpha_OTU22	Contig AL67_1B_2_178	Alpha-proteobacteria		0	0	0	2	0	2	AJ639893
Alpha_OTU23	Contig AQ2_1B_2_17	Alpha-proteobacteria		0	1	0	0	0	1	EF445287
Alpha_OTU24	Contig AL31_1B_2_126	Alpha-proteobacteria		0	0	1	0	0	1	FJ009391
Alpha_OTU25	Contig AL31_1B_2_73	Alpha-proteobacteria		0	0	1	0	0	1	DQ103632
Alpha_OTU26	Contig AL31_1B_2_71	Alpha-proteobacteria		0	0	3	0	0	3	EF125408
Alpha_OTU27	Contig AQ1_1B_2_199	Alpha-proteobacteria		1	0	0	0	0	1	AY957911
Alpha_OTU28	Contig AL52_1B_2_13	Alpha-proteobacteria		2	0	0	0	1	3	EF632942
Alpha_OTU29	Contig AL52_1B_2_12	Alpha-proteobacteria		0	0	0	0	2	2	FJ152576
Alpha_OTU30	Contig AL52_1B_2_31	Alpha-proteobacteria		0	0	0	0	1	1	DQ404752
Alpha_OTU31	Contig AL52_1B_2_98	Alpha-proteobacteria		0	0	0	0	1	1	FJ152767
Alpha_OTU32	Contig AQ1_1B_1_73	Alpha-proteobacteria		1	0	0	0	0	1	FJ517108
Alpha_OTU33	Contig AL31_1B_2_171	Alpha-proteobacteria		0	0	2	0	0	2	EU735674
Alpha_OTU34	Contig AQ2_1B_1_61	Alpha-proteobacteria		0	1	0	0	0	1	AY957935
Alpha_OTU35	Contig AL52_1B_2_64	Alpha-proteobacteria		0	0	0	0	1	1	FJ152772
Alpha_OTU36	Contig AQ2_1B_1_38	Alpha-proteobacteria		0	1	0	0	0	1	DQ432334

# ANNEXES

Alpha_OTU37	Contig AL31_1B_2_02	Alpha- proteobacteria		0	0	5	1	0		6	EU662567
Alpha_OTU38	Contig AQ1_1B_2_176	Alpha- proteobacteria		1	0	0	0	0		1	EU753663
Alpha_OTU39	Contig AL31_1B_2_114	Alpha- proteobacteria		0	0	2	1	0		3	EU753663
Alpha_OTU40	Contig AQ1_1B_1_90	Alpha- proteobacteria		3	0	3	0	0		6	EU753663
Alpha_OTU41	Contig AL31_1B_2_128	Alpha- proteobacteria		1	0	10	0	0		11	EU753663
Alpha_OTU42	C02 AL52_1B_133 (partial)	Alpha- proteobacteria		0	0	0	0	3		3	EU753663
Alpha_OTU43	Contig AQ1_1B_2_124	Alpha- proteobacteria		2	0	0	0	0		2	EU753663
Alpha_OTU44	Contig AQ1_1B_2_181	Alpha- proteobacteria		1	0	0	0	0		1	FM200984
Alpha_OTU45	Contig AL67_1B_2_194	Alpha- proteobacteria		0	0	0	1	0		1	AM990830
Alpha_OTU46	Contig AL52_1B_2_174	Alpha- proteobacteria		0	0	0	0	2		2	EF540362
Alpha_OTU47	Contig AQ1_1B_2_80	Alpha- proteobacteria		1	0	0	0	0		1	AM176848
Alpha_OTU48	Contig AL31_1B_2_101	Alpha- proteobacteria		0	0	1	0	0		1	Y09609
Alpha_OTU49	Contig AQ2_1B_1_10	Alpha- proteobacteria		0	1	0	0	0		1	DQ346506
Alpha_OTU50	Contig AQ2_1B_2_140	Alpha- proteobacteria		0	1	0	0	0		1	FJ152890
Alpha_OTU51	Contig AL67_1B_2_53	Alpha- proteobacteria		0	0	0	1	0		1	FJ516790
Alpha_OTU52	Contig AL67_1B_2_87	Alpha- proteobacteria		0	0	0	5	0		5	FJ516816
Alpha_OTU53	Contig AL31_1B_2_123	Alpha- proteobacteria		0	0	1	0	0		1	AF445668
Alpha_OTU54	Contig AL64_1B_1_14	Alpha- proteobacteria		0	0	1	0	0		1	AJ315683
Alpha_OTU55	Contig AL52_1B_2_84	Alpha- proteobacteria		0	0	0	0	1		1	AY258094
Alpha_OTU56	Contig AL52_1B_2_136	Alpha- proteobacteria		0	0	0	0	1		1	AY345479
Alpha_OTU57	Contig AL52_1B_2_143	Alpha- proteobacteria		0	0	2	0	1		3	AB355069
Alpha_OTU58	Contig AL52_1B_2_128	Alpha- proteobacteria		0	0	0	0	1		1	DQ342319
Alpha_OTU59	Contig AQ1_1B_2_106	Alpha- proteobacteria		1	1	0	0	0		2	EU799556
Alpha_OTU60	Contig AL64_1B_1_37	Alpha- proteobacteria		0	0	1	0	0		1	DQ376570
Alpha_OTU61	Contig AQ1_1B_2_39	Alpha- proteobacteria		1	0	0	0	0		1	AY145582
Alpha_OTU62	Contig AL31_1B_2_163	Alpha- proteobacteria		0	0	4	0	0		4	DQ191822



# ANNEXES

Alpha_OTU63	Contig AL52_1B_1_34	Alpha- proteobacteria		0	0	0	20	17		37	EF157114
Alpha_OTU64	Contig AQ1_1B_2_76	Alpha- proteobacteria		1	0	0	0	0		1	EU097279
Alpha_OTU65	Contig AL52_1B_1_32	Alpha- proteobacteria		1	0	0	0	10		11	EU735614
Alpha_OTU66	Contig AL52_1B_2_119	Alpha- proteobacteria		0	0	0	0	13		13	DQ401091
Alpha_OTU67	Contig AL67_1B_2_34	Alpha- proteobacteria		0	0	0	3	6		9	FJ463255
Alpha_OTU68	Contig AL52_1B_2_81	Alpha- proteobacteria		0	3	0	0	1		4	EU491219
Alpha_OTU69	Contig AL52_1B_2_161	Alpha- proteobacteria		0	0	0	0	1		1	AY345437
beta_OTU01	Contig AQ2_1B_1_57	Beta- proteobacteria		0	1	0	0	0		1	CP001392
beta_OTU02	Contig AL67_1B_2_104	Beta- proteobacteria		0	21	1	38	3		63	AY959107
beta_OTU03	Contig AL31_1B_2_148	Beta- proteobacteria		0	0	1	0	0		1	AF487435
beta_OTU04	Contig AQ1_1B_2_166	Beta- proteobacteria		4	0	0	0	0		4	EF032746
beta_OTU05	Contig AQ1_1B_1_01	Beta- proteobacteria		1	0	0	0	0		1	FJ517015
beta_OTU06	Contig AQ2_1B_1_01	Beta- proteobacteria		0	2	0	0	1		3	AJ536815
beta_OTU07	Contig AQ1_1B_2_165	Beta- proteobacteria		9	0	0	0	0		9	EF192884
beta_OTU08	Contig AQ2_1B_1_45	Beta- proteobacteria		0	2	0	0	0		2	AY830778
beta_OTU09	Contig AQ2_1B_1_53	Beta- proteobacteria		0	1	0	0	0		1	FJ516907
beta_OTU10	Contig AQ2_1B_2_182	Beta- proteobacteria		0	10	0	0	0		10	EF654714
beta_OTU11	Contig AQ1_1B_2_187	Beta- proteobacteria		1	0	0	0	0		1	EU735692
beta_OTU12	Contig AQ1_1B_2_14	Beta- proteobacteria		1	0	0	0	0		1	FJ517019
beta_OTU13	Contig AQ1_1B_2_173	Beta- proteobacteria		1	0	0	0	0		1	FJ535025
beta_OTU14	Contig AQ1_1B_2_118	Beta- proteobacteria		1	0	0	0	0		1	FJ479588
beta_OTU15	Contig AQ1_1B_2_29	Beta- proteobacteria		1	0	0	0	0		1	EF612412
Gamma_OTU01	Contig AQ2_1B_1_72	Gamma- proteobacteria		0	1	0	0	0		1	DQ213024
Gamma_OTU02	Contig AQ1_1B_2_69	Gamma- proteobacteria		1	0	0	0	0		1	AR255939
Gamma_OTU04	Contig AQ2_1B_2_132	Gamma- proteobacteria		0	5	0	0	1		6	AM743169
Gamma_OTU05	Contig AL52_1B_2_170	Gamma- proteobacteria		0	0	0	0	2		2	FJ152597

# ANNEXES

Gamma_OTU06	Contig AL31_1B_2_32	Gamma- proteobacteria		0	0	1	0	0		1	DQ532277
Gamma_OTU07	Contig AQ1_1B_2_111	Gamma- proteobacteria		1	0	0	0	1		2	AB478683
Gamma_OTU09	Contig AL31_1B_2_19	Gamma- proteobacteria		0	0	1	0	2		3	DQ302442
Gamma_OTU10	Contig AL31_1B_2_37	Gamma- proteobacteria		0	0	2	0	1		3	DQ302442
Gamma_OTU11	Contig AL52_1B_2_85	Gamma- proteobacteria		5	0	2	2	1		10	EF612422
Gamma_OTU12	Contig AQ1_1B_2_200	Gamma- proteobacteria		1	0	0	0	0		1	FJ264749
Gamma_OTU13	Contig AQ1_1B_2_180	Gamma- proteobacteria		1	0	0	0	0		1	FJ230893
Gamma_OTU14	Contig AQ1_1B_1_34	Gamma- proteobacteria		1	0	0	0	0		1	FJ230893
Gamma_OTU15	Contig AQ2_1B_1_58	Gamma- proteobacteria		0	1	0	0	0		1	FJ230893
Gamma_OTU16	Contig AQ1_1B_1_07	Gamma- proteobacteria		1	0	0	0	0		1	EF999376
Gamma_OTU17	Contig AQ1_1B_2_109	Gamma- proteobacteria		7	0	0	0	0		7	EF580955
Gamma_OTU18	Contig AQ2_1B_2_235	Gamma- proteobacteria		0	1	0	0	0		1	FJ152572
Gamma_OTU19	Contig AL52_1B_2_166	Gamma- proteobacteria		0	0	0	0	2		2	FJ152997
Gamma_OTU20	Contig AQ1_1B_1_14	Gamma- proteobacteria		1	0	0	0	0		1	FJ205335
Gamma_OTU21	Contig AQ1_1B_1_72	Gamma- proteobacteria		1	3	0	1	0		5	FM208850
Gamma_OTU22	Contig AL67_1B_2_66	Gamma- proteobacteria		0	0	0	2	0		2	DQ327699
Gamma_OTU23	Contig AL52_1B_2_68	Gamma- proteobacteria		0	0	0	0	1		1	AM183347
Gamma_OTU24	Contig AL52_1B_2_163	Gamma- proteobacteria		0	0	0	0	1		1	EU491392
Gamma_OTU25	Contig AL52_1B_2_175	Gamma- proteobacteria		0	0	0	0	2		2	AY225632
Gamma_OTU26	Contig AQ1_1B_2_18	Gamma- proteobacteria		1	0	0	0	0		1	DQ823220
Gamma_OTU27	Contig AQ1_1B_1_36	Gamma- proteobacteria		1	0	0	0	0		1	AF424122
Delta_OTU01	Contig AQ1_1B_2_10	Delta- proteobacteria		1	0	0	0	0		1	EU734976
Delta_OTU02	Contig AQ1_1B_1_61	Delta- proteobacteria		1	0	0	0	0		1	EU881182
Delta_OTU03	Contig AQ2_1B_1_12	Delta- proteobacteria		0	1	0	0	0		1	EU234198
Delta_OTU04	Contig AQ2_1B_1_59	Delta- proteobacteria		0	1	0	0	0		1	DQ125908
Delta_OTU05	Contig AQ1_1B_1_26	Delta- proteobacteria		3	0	0	0	0		3	FJ207003

# ANNEXES

Delta_O TU06	Contig AQ1_1B_1_20	Delta- proteobacteria		15	0	1	0	4		20	FJ207003
Delta_O TU07	Contig AQ1_1B_2_41	Delta- proteobacteria		1	0	0	0	0		1	FJ873368
Delta_O TU08	Contig AQ1_1B_1_77	Delta- proteobacteria		1	0	0	0	0		1	AF407700
Delta_O TU09	Contig AL52_1B_1_24	Delta- proteobacteria		0	0	0	0	1		1	FM242397
Delta_O TU10	Contig AQ2_1B_2_157	Delta- proteobacteria		0	1	0	0	0		1	FJ479050
Delta_O TU11	Contig AQ2_1B_2_66	Delta- proteobacteria		0	2	0	0	0		2	FJ479235
Delta_O TU12	Contig AQ1_1B_2_110	Delta- proteobacteria		1	0	0	0	0		1	AB286618
Delta_O TU13	Contig AQ2_1B_2_248	Delta- proteobacteria		0	2	0	0	0		2	FJ479170
Delta_O TU14	Contig AQ1_1B_1_81	Delta- proteobacteria		1	0	0	0	0		1	AB252740
Delta_O TU15	Contig AQ1_1B_2_98	Delta- proteobacteria		1	0	0	0	0		1	EF632754
Delta_O TU16	Contig AQ2_1B_2_245	Delta- proteobacteria		0	1	0	0	0		1	AB110542
Delta_O TU17	Contig AL52_1B_2_45	Delta- proteobacteria		0	0	0	0	1		1	AY897123
Delta_O TU18	Contig AL31_1B_2_54	Delta- proteobacteria		0	0	1	0	0		1	DQ129144
Delta_O TU19	Contig AQ2_1B_1_30	Delta- proteobacteria		0	1	0	0	0		1	EU335166
Firmi_O TU1	Contig AQ2_1B_2_100	Firmicutes		0	1	0	0	0		1	AB486566
Firmi_O TU10	Contig AQ2_1B_2_215	Firmicutes		0	1	0	0	0		1	AF129867
Firmi_O TU11	Contig AQ2_1B_2_188	Firmicutes		0	0	0	0	1		1	AM162329
Firmi_O TU12	Contig AQ1_1B_1_86	Firmicutes		0	7	0	0	0		7	AJ617805
Firmi_O TU13	Contig AL52_1B_2_54	Firmicutes		0	2	0	0	0		2	EF516461
Firmi_O TU14	Contig AQ2_1B_2_107	Firmicutes		0	0	0	0	2		2	AB237717
Firmi_O TU16	Contig AQ2_1B_2_192	Firmicutes		0	3	0	0	0		3	AB237717
Firmi_O TU17	Contig AQ2_1B_2_117	Firmicutes		0	36	0	0	0		36	AY538171
Firmi_O TU18	Contig AQ2_1B_2_142	Firmicutes		0	11	0	0	0		11	AB478010
Firmi_O TU19	Contig AQ2_1B_2_60	Firmicutes		0	0	0	0	1		1	AB267054
Firmi_O TU2	Contig AL52_1B_2_201	Firmicutes		0	1	0	0	0		1	AB486679
Firmi_O TU3	Contig AQ2_1B_2_141	Firmicutes		0	2	0	0	0		2	FJ535043

# ANNEXES

Firmi_O TU4	Contig AQ2_1B_2_125	Firmicutes		1	0	0	0	0		1	DQ129560
Firmi_O TU5	Contig AL52_1B_2_76	Firmicutes		0	0	0	0	1		1	AY753402
Firmi_O TU6	Contig AQ2_1B_2_147	Firmicutes		0	1	0	0	0		1	AF349758
Firmi_O TU7	Contig AQ2_1B_2_103	Firmicutes		0	5	0	0	0		5	DQ643978
Firmi_O TU8	Contig AQ2_1B_2_164	Firmicutes		0	2	0	0	0		2	AY682207
Firmi_O TU9	Contig AL52_1B_2_35	Firmicutes		0	1	0	0	0		1	AY167932
Actino_ OTU01	Contig AL67_1B_2_117	Actinobacteria		0	0	0	4	0		4	AB476281
Actino_ OTU02	Contig AL64_1B_1_24	Actinobacteria		0	0	1	0	3		4	FJ203576
Actino_ OTU03	Contig AL52_1B_2_16	Actinobacteria		0	0	0	0	1		1	AB360344
Actino_ OTU04	Contig AL52_1B_2_169	Actinobacteria		0	0	0	0	3		3	AB360344
Actino_ OTU05	Contig AL52_1B_2_156	Actinobacteria		0	0	0	0	1		1	AY093455
Actino_ OTU06	Contig AL52_1B_2_204	Actinobacteria		0	0	0	0	1		1	AY093455
Actino_ OTU07	Contig AL52_1B_2_104	Actinobacteria		0	0	0	0	1		1	EF632945
Actino_ OTU08	Contig AL52_1B_1_18	Actinobacteria		1	0	0	0	3		4	EF540358
Actino_ OTU09	Contig AL52_1B_2_126	Actinobacteria		0	0	0	0	1		1	EU328001
Actino_ OTU10	Contig AL67_1B_2_95	Actinobacteria		0	0	0	5	6		11	EU735677
Actino_ OTU11	Contig AQ2_1B_1_35	Actinobacteria		0	2	0	0	0		2	AM911348
Actino_ OTU12	Contig AQ2_1B_2_173	Actinobacteria		0	2	0	0	0		2	EU214943
Actino_ OTU13	Contig AQ2_1B_2_75	Actinobacteria		0	1	0	0	0		1	FJ152655
Actino_ OTU14	Contig AL52_1B_1_22	Actinobacteria		0	0	0	0	4		4	EU016408
Actino_ OTU15	Contig AL31_1B_2_105	Actinobacteria		0	0	1	0	0		1	AY642541
Actino_ OTU16	Contig AQ2_1B_2_136	Actinobacteria		0	1	0	0	0		1	EU812978
Actino_ OTU17	Contig AQ2_1B_2_161	Actinobacteria		0	3	0	0	0		3	U65647
Verruco_ OTU01	Contig AL31_1B_2_147	Verruco- microbia		0	0	1	0	0		1	DQ648945
Verruco_ OTU02	Contig AL52_1B_2_53	Verruco- microbia		0	1	0	0	1		2	DQ648945
Verruco_ OTU03	Contig AQ1_1B_2_189	Verruco- microbia		1	0	0	0	0		1	DQ648945

# ANNEXES

Verruco_OTU04	Contig AQ1_1B_2_99	Verruco-microbia		1	0	0	0	0	1	FJ479434
Verruco_OTU05	Contig AQ2_1B_1_51	Verruco-microbia		0	1	0	0	0	1	EU803358
plancto_OTU01	Contig AQ1_1B_2_66	Plancto-mycetales		1	0	0	0	0	1	AM902596
plancto_OTU02	Contig AQ1_1B_1_70	Plancto-mycetales		2	0	0	0	0	2	DQ514037
plancto_OTU03	Contig AQ2_1B_1_47	Plancto-mycetales		0	1	0	0	0	1	DQ514037
plancto_OTU04	Contig AQ1_1B_2_03	Plancto-mycetales		1	0	0	0	0	1	AY168744
plancto_OTU05	Contig AQ1_1B_1_37	Plancto-mycetales		1	0	0	0	0	1	FJ207109
plancto_OTU06	Contig AQ1_1B_1_38	Plancto-mycetales		1	0	0	0	0	1	EU335417
plancto_OTU07	Contig AQ2_1B_1_11	Plancto-mycetales		0	1	0	0	0	1	AB473908
plancto_OTU08	Contig AQ1_1B_1_80	Plancto-mycetales		2	0	0	0	0	2	AB473908
plancto_OTU09	Contig AQ2_1B_1_07	Plancto-mycetales		0	1	0	0	0	1	FJ232665
plancto_OTU10	Contig AQ1_1B_1_15	Plancto-mycetales		1	0	0	0	0	1	EU160057
plancto_OTU11	Contig AQ1_1B_2_26	Plancto-mycetales		1	0	0	0	0	1	EU044298
plancto_OTU12	Contig AQ2_1B_2_71	Plancto-mycetales		0	2	0	0	0	2	EF516397
plancto_OTU13	Contig AL52_1B_1_09	Plancto-mycetales		0	0	0	0	1	1	AB430337
plancto_OTU14	Contig AQ1_1B_1_06	Plancto-mycetales		2	0	0	0	0	2	EU083504
plancto_OTU15	Contig AL31_1B_2_83	Plancto-mycetales		0	0	1	0	0	1	FJ516934
plancto_OTU16	Contig AL31_1B_2_15	Plancto-mycetales		0	0	4	0	0	4	EU735645
plancto_OTU17	Contig AQ1_1B_2_159	Plancto-mycetales		1	0	0	0	0	1	AB491915
plancto_OTU18	Contig AQ1_1B_1_63	Plancto-mycetales		1	0	0	0	0	1	FJ517063
plancto_OTU19	Contig AL31_1B_2_09	Plancto-mycetales		0	0	1	0	0	1	EU917921
plancto_OTU20	Contig AQ2_1B_1_70	Plancto-mycetales		0	1	0	0	0	1	FJ517063
plancto_OTU21	Contig AL31_1B_2_100	Plancto-mycetales		0	0	1	0	2	3	FJ202945
plancto_OTU22	Contig AL31_1B_2_166	Plancto-mycetales		0	0	1	0	0	1	FJ516934
plancto_OTU23	Contig AQ1_1B_2_48	Plancto-mycetales		1	0	0	0	0	1	FJ516934
plancto_OTU24	Contig AQ1_1B_2_171	Plancto-mycetales		2	0	0	0	0	2	AB286397

# ANNEXES

plancto_OTU25	Contig AQ2_1B_2_83	Plancto-mycetales		0	2	0	0	0	2	AB491859
plancto_OTU26	Contig AL52_1B_2_160	Plancto-mycetales		0	1	0	0	1	2	EF522841
plancto_OTU27	Contig AL52_1B_2_131	Plancto-mycetales		0	0	0	0	2	2	EU491354
plancto_OTU28	Contig AQ1_1B_2_82	Plancto-mycetales		2	0	0	0	0	2	AM935485
plancto_OTU29	Contig AQ1_1B_2_94	Plancto-mycetales		1	0	0	0	0	1	AY921932
plancto_OTU30	Contig AQ1_1B_2_84	Plancto-mycetales		1	0	0	0	0	1	FJ710707
plancto_OTU31	Contig AQ1_1B_2_117	Plancto-mycetales		1	1	1	0	0	3	EF520616
plancto_OTU32	Contig AQ2_1B_2_197	Plancto-mycetales		0	1	0	0	0	1	DQ228400
plancto_OTU33	Contig AL31_1B_2_22	Plancto-mycetales		0	0	2	0	0	2	DQ228400
plancto_OTU34	Contig AQ1_1B_1_16	Plancto-mycetales		1	0	0	0	0	1	AY266450
plancto_OTU35	Contig AL52_1B_2_59	Plancto-mycetales		0	0	0	0	1	1	DQ513078
plancto_OTU36	Contig AQ2_1B_1_09	Plancto-mycetales		0	1	0	0	0	1	AF407728
plancto_OTU37	Contig AQ1_1B_1_33	Plancto-mycetales		1	0	0	0	0	1	DQ269110
plancto_OTU38	Contig AL67_1B_2_16	Plancto-mycetales		0	0	0	3	0	3	EU491279
plancto_OTU39	Contig AL52_1B_1_28	Plancto-mycetales		0	0	0	0	1	1	AF317785
plancto_OTU40	Contig AQ1_1B_1_75	Plancto-mycetales		1	0	0	0	0	1	FJ516830
plancto_OTU41	Contig AQ2_1B_1_40	Plancto-mycetales		1	6	0	0	0	1	EF516837
plancto_OTU42	Contig AL67_1B_2_160	Plancto-mycetales		0	0	0	3	0	3	FJ872532
plancto_OTU43	Contig AL67_1B_2_195	Plancto-mycetales		0	0	0	1	0	1	DQ376578
plancto_OTU44	Contig AQ1_1B_1_32	Plancto-mycetales		1	1	1	0	1	4	FJ542870
plancto_OTU45	Contig AQ2_1B_1_32	Plancto-mycetales		0	1	0	0	0	1	AB257645
plancto_OTU46	Contig AL31_1B_2_179	Plancto-mycetales		0	0	1	0	0	1	AJ231190
plancto_OTU47	Contig AL52_1B_2_146	Plancto-mycetales		0	0	0	0	1	1	EU979049
plancto_OTU48	Contig AQ1_1B_1_19	Plancto-mycetales		1	0	0	0	0	1	DQ811897
plancto_OTU49	Contig AL52_1B_2_206	Plancto-mycetales		0	0	0	0	1	1	FJ543000
plancto_OTU50	Contig AL52_1B_2_99	Plancto-mycetales		0	0	0	0	1	1	EU491748

# ANNEXES

plancto_OTU51	Contig AL31_1B_2_172	Plancto- mycetales		0	0	1	0	1		2	DQ270660
plancto_OTU52	Contig AL31_1B_2_208	Plancto- mycetales		0	0	3	0	0		3	FJ203446
plancto_OTU53	Contig AQ1_1B_2_160	Plancto- mycetales		1	0	0	0	0		1	EU135192
plancto_OTU54	Contig AL52_1B_2_05	Plancto- mycetales		1	0	0	0	1		2	FJ542957
plancto_OTU55	Contig AQ1_1B_1_13	Plancto- mycetales		1	0	0	0	0		1	EF530681
plancto_OTU56	Contig AQ2_1B_1_21	Plancto- mycetales		0	1	0	0	0		1	FJ479541
plancto_OTU57	Contig AL67_1B_2_128	Plancto- mycetales		0	0	0	1	0		1	FJ624378
plancto_OTU58	Contig AL52_1B_2_172	Plancto- mycetales		0	0	0	0	5		5	AM176894
plancto_OTU59	Contig AQ1_1B_2_208	Plancto- mycetales		1	0	0	0	0		1	DQ256553
plancto_OTU60	Contig AL52_1B_1_41	Plancto- mycetales		0	0	0	0	1		1	FJ542976
plancto_OTU61	Contig AQ1_1B_2_95	Plancto- mycetales		2	0	0	0	0		2	FJ203554
plancto_OTU62	Contig AQ1_1B_1_50	Plancto- mycetales		1	0	0	0	0		1	AM902598
chlofl_O TU01	Contig AL67_1B_2_105	Chloroflexi		0	0	0	1	0		1	DQ329894
chlofl_O TU02	Contig AL67_1B_2_154	Chloroflexi		0	0	0	1	0		1	FJ152675
chlofl_O TU03	Contig AQ2_1B_1_67	Chloroflexi		0	1	0	0	0		1	AF234705
chlofl_O TU04	Contig AL31_1B_2_07	Chloroflexi		0	0	1	0	0		1	EF126227
chlofl_O TU05	Contig AQ1_1B_1_10	Chloroflexi		1	0	0	0	0		1	EF205529
chlofl_O TU06	Contig AL31_1B_2_142	Chloroflexi		0	0	2	0	0		2	EF141855
chlofl_O TU07	Contig AL52_1B_2_51	Chloroflexi		0	0	0	0	1		1	EU735629
chlofl_O TU08	Contig AL52_1B_2_94	Chloroflexi		0	0	0	0	2		2	DQ297988
chlofl_O TU09	Contig AQ1_1B_2_115	Chloroflexi		1	0	0	0	0		1	FJ710669
chlofl_O TU10	Contig AL67_1B_2_187	Chloroflexi		0	0	0	1	0		1	EF208677
chlofl_O TU11	Contig AL31_1B_2_35	Chloroflexi		0	0	3	0	0		3	DQ424601
gemma_OTU01	Contig AQ2_1C_2_12	Gemmatimona detes		0	3	0	0	0		3	AF268993
gemma_OTU02	Contig AQ1_1B_2_153	Gemmatimona detes		1	0	0	0	0		1	EU803543
gemma_OTU03	Contig AQ1_1B_2_74	Gemmatimona detes		1	0	0	0	0		1	DQ839330



# ANNEXES

<b>gemma_OTU04</b>	Contig AL31_1B_2_154	Gemmatimona detes		0	0	1	0	0		1	FJ152644
<b>gemma_OTU05</b>	Contig AQ2_1B_2_50	Gemmatimona detes		0	1	0	0	0		1	DQ125655
<b>gemma_OTU06</b>	Contig AQ1_1B_2_143	Gemmatimona detes		2	0	0	0	0		2	FJ152768
<b>gemma_OTU07</b>	Contig AQ1_1B_1_60	Gemmatimona detes		1	0	0	0	0		1	FJ479166
<b>acido_OTU01</b>	Contig AQ2_1B_2_167	Acidobacteria		0	1	0	0	0		1	FM877548
<b>acido_OTU02</b>	Contig AQ1_1B_1_47	Acidobacteria		1	0	0	0	1		2	FJ152577
<b>acido_OTU03</b>	Contig AL64_1B_1_21	Acidobacteria		0	0	0	0	1		1	FJ660500
<b>acido_OTU04</b>	Contig AQ1_1B_1_27	Acidobacteria		1	1	0	0	0		2	EF095002
<b>acido_OTU05</b>	Contig AQ2_1B_1_68	Acidobacteria		0	1	0	0	0		1	EU244033
<b>acido_OTU06</b>	Contig AQ1_1B_2_38	Acidobacteria		1	0	0	0	0		1	AB179692
<b>acido_OTU07</b>	Contig AQ1_1B_2_139	Acidobacteria		1	0	0	0	0		1	AY945875
<b>acido_OTU08</b>	Contig AQ1_1B_2_44	Acidobacteria		1	0	0	0	0		1	FJ478495
<b>acido_OTU09</b>	Contig AQ1_1B_2_97	Acidobacteria		1	0	0	0	0		1	AM935295
<b>acido_OTU10</b>	Contig AQ1_1B_2_179	Acidobacteria		1	0	0	0	0		1	DQ984565
<b>acido_OTU11</b>	Contig AQ1_1B_1_29	Acidobacteria		2	0	0	0	0		2	EU287178
<b>acido_OTU12</b>	Contig AQ2_1B_2_112	Acidobacteria		0	4	0	0	0		4	FJ516981
<b>bact_OTU01</b>	Contig AQ2_1B_2_246	Bacteroidetes		0	3	0	0	0		3	AY739663
<b>bact_OTU02</b>	Contig AL67_1B_2_44	Bacteroidetes		1	0	0	0	0		1	AB078054
<b>bact_OTU03</b>	Contig AL31_1B_2_86	Bacteroidetes		0	0	1	0	0		1	FJ623342
<b>bact_OTU04</b>	Contig AQ1_1B_2_85	Bacteroidetes		2	0	0	0	0		2	FJ623342
<b>bact_OTU05</b>	Contig AQ2_1B_2_89	Bacteroidetes		0	1	0	0	0		1	FJ710659
<b>bact_OTU06</b>	Contig AQ1_1B_2_135	Bacteroidetes		3	0	0	0	0		3	FJ516813
<b>bact_OTU07</b>	Contig AQ2_1B_2_82	Bacteroidetes		0	2	0	0	0		2	FJ716039
<b>bact_OTU08</b>	Contig AQ2_1B_2_121	Bacteroidetes		0	3	0	0	0		3	EU104288
<b>bact_OTU09</b>	Contig AQ2_1B_1_36	Bacteroidetes		0	1	0	0	0		1	EU589303
<b>bact_OTU10</b>	Contig AQ1_1B_1_35	Bacteroidetes		1	0	0	0	0		1	EU050911

# ANNEXES

bact_OT U11	Contig AQ1_1B_2_37	Bacteroidetes		0	1	0	0	0	1	FM866274
bact_OT U12	Contig AL31_1B_2_34	Bacteroidetes		1	0	1	0	0	2	FJ665202
bact_OT U13	Contig AL31_1B_2_161	Bacteroidetes		0	0	1	0	0	1	FJ516770
bact_OT U14	Contig AQ1_1B_2_155	Bacteroidetes		1	0	0	0	0	1	FJ516770
bact_OT U15	Contig AL67_1B_2_14	Bacteroidetes		0	0	0	1	1	2	FJ545565
bact_OT U16	Contig AL31_1B_2_76	Bacteroidetes		0	0	1	0	0	1	DQ993343
bact_OT U17	Contig AQ2_1B_2_119	Bacteroidetes		0	2	0	0	0	2	EF659422
bact_OT U18	Contig AQ2_1B_2_145	Bacteroidetes		0	3	0	0	0	3	EF516898
bact_OT U19	Contig AL31_1B_2_56	Bacteroidetes		0	0	1	0	0	1	FJ644613
bact_OT U20	Contig AL31_1B_2_156	Bacteroidetes		0	0	2	0	0	2	CU922258
bact_OT U21	Contig AQ1_1B_2_113	Bacteroidetes		1	0	0	0	0	1	EU177744
bact_OT U22	Contig AQ1_1B_2_101	Bacteroidetes		1	0	0	0	0	1	EU431772
bact_OT U23	Contig AL31_1B_2_14	Bacteroidetes		0	0	1	0	0	1	AY533663
bact_OT U24	Contig AL52_1B_2_90	Bacteroidetes		0	0	0	0	2	2	EU283594
bact_OT U25	Contig AQ2_1B_2_199	Bacteroidetes		0	1	0	0	0	1	EU925913
bact_OT U26	Contig AQ2_1B_1_43	Bacteroidetes		0	1	0	0	0	1	DQ890437
bact_OT U27	Contig AQ1_1B_1_92	Bacteroidetes		2	0	0	0	0	2	DQ890437
chlorobi _OTU1	Contig AQ1_1B_2_156	Chlorobi		3	0	0	0	0	3	EU283596
BRC1_ OTU01	Contig AQ1_1B_1_64	BRC1		1	0	0	0	0	1	AF445671
BRC1_ OTU02	Contig AQ1_1B_2_65	BRC1		1	0	0	0	0	1	EU328038
DeiTh_ OTU01	Contig AL31_1B_2_168	Deinococcales- Thermus		0	0	1	0	0	1	DQ129340
Nitro_O TU01	Contig AQ1_1B_2_28	Nitrospirae		4	0	0	0	1	5	DQ058676
NKB1_0 1	Contig AQ1_1B_1_95	NKB1		1	0	0	0	0	1	EU245335
NKB1_0 2	Contig AQ2_1B_2_206	NKB1		0	1	0	0	0	1	CU926624
NKB1_0 3	Contig AQ1_1B_2_177	NKB1		1	0	0	0	0	1	EU245335
NKB1_0 4	Contig AQ1_1B_2_92	NKB1		1	0	0	0	0	1	FJ205199

# ANNEXES

OP11_O TU01	Contig AL52_1B_2_113	OP11		0	0	0	0	2		2	AF419659				
OP11_O TU02	Contig AL52_1B_2_58	OP11		0	0	0	0	1		1	AB252964				
OP11_O TU03	Contig AQ2_1B_2_127	OP11		0	3	0	0	0		3	FJ516948				
OP11_O TU04	Contig AQ1_1B_2_91	OP11		1	0	0	0	0		1	AF507713				
OP3_OT U01	Contig AQ1_1B_2_42	OP3		2	0	0	0	0		2	AJ390463				
SBR1_O TU01	Contig AQ1_1B_1_87	SBR1		1	0	0	0	0		1	EF157196				
Spiro_O TU01	Contig AL31_1B_2_01	Spirochaetes		0	0	1	0	0		1	AJ565434				
Spiro_O TU02	Contig AL31_1B_2_94	Spirochaetes		0	0	1	0	0		1	DQ028376				
Spiro_O TU03	Contig AL52_1B_2_123	Spirochaetes		0	0	0	0	1		1	EU245996				
TM6_OT U01	Contig AL52_1B_2_208	TM6		0	0	0	0	1		1	AB425065				
WS6_O TU01	Contig AQ2_1B_2_191	WS6		0	8	0	0	0	8	EF032771					
total				267	247	197	196	236	158	145	61	62	100	1669	

# ANNEXES

## Annexe 5 : Résumé des données issues du clonage du SSU rDNA des eucaryotes avec des amorces ciblant les protistes (5E)

Reference Sequence	Taxonomy		Number of clones in each library										BLAST (First Hit)
			AQ1	AQ1 b	AQ1 o	AQ2	AQ2b	AQ2o	AL31	AL67	AL52	Total	
Contig AQ2_5E_31	amoebzoa		0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	[AB510393.1] Uncultured eukaryote gene for 18S rRNA, partial sequence
Contig AQ2_5E_20	amoebzoa		0	0	0	7	2	0	0	0	0	9	[AB425950.1] Lobosea sp. Mb_5C gene for 18S ribosomal RNA
Contig AQ1o_5E_22	amoebzoa		0	4	1	0	0	0	0	0	0	5	[GU923112.1] Uncultured eukaryote clone F5K2Q4C04I9VCV 18S ribosomal RNA gene
Contig AQ1o_5E_13	amoebzoa		0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	[FJ577818.1] Uncultured Amoebzoa clone Orly11 18S ribosomal RNA gene
Contig AQ2b_5E_39	amoebzoa		0	0	0	3	3	0	0	0	0	6	[AB521581.1] Uncultured eukaryote gene for 18S rRNA
Contig AQ1b_5E_11	amoebzoa		0	3	0	2	3	3	0	0	0	11	[EU087280.1] Uncultured eukaryote clone 9_69 18S
Contig AQ1b_5E_17	choanoflagellida		0	3	0	0	0	0	0	0	0	3	[AF084231.1] Desmarella moniliformis 18S ribosomal RNA gene
Clone AQ1_5E_68	choanoflagellida		3	0	0	0	0	0	0	0	0	3	[EF023370.1] Codonosigidae environmental sample clone Amb_18S_701 18S
Contig AQ1_5E_40	choanoflagellida		1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	[FN690482.1] Uncultured eukaryote partial 18S rRNA gene, clone 3c-C
Contig AQ1_5E_44	choanoflagellida		4	2	0	0	0	0	0	0	0	6	[FN690482.1] Uncultured eukaryote partial 18S rRNA gene, clone 3c-C
Contig AQ1b_5E_30	choanoflagellida		0	2	0	1	0	0	0	0	0	3	[AY821949.1] Uncultured choanoflagellate clone CV1_B2_17
Contig AQ2_5E_37	fungi		0	0	0	3	0	0	0	0	0	3	[HM030909.1] Uncultured eukaryote clone Th260208_1 18S
Contig AQ2_5E_47	fungi		0	0	0	2	0	0	0	0	0	2	[EU647044.1] Uncultured Pucciniomycotina clone D0735_42_M small subunit ribosomal
Contig AL52_5E_20	fungi		0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	[AB451532.1] Uncultured fungus gene for 18S rRNA
Contig AQ2o_5E_11	fungi		0	0	0	2	0	3	0	0	0	5	[AF082856.1] AF082856 Stereum ostrea small subunit ribosomal RNA gene
Clone AQ1b_5E_36	fungi		0	3	0	0	0	0	0	0	0	3	[AB214655.1] Verticillium insectorum genes for 18S rRNA
Contig AQ2o_5E_07	fungi		0	2	0	0	1	2	0	0	0	5	[AY392130.1] Acremonium sp. Dh3 18S ribosomal RNA gene
Contig AQ1b_5E_13	fungi		0	3	0	1	8	0	0	0	0	12	[DQ401104.1] Paecilomyces sp. 080834 18S ribosomal RNA gene

# ANNEXES

Contig AL31_5E_26	fungi		0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	[AB028190.1] <i>Penicillium namyslowskii</i> gene for 18S rRNA
Contig AQ1b_5E_32	fungi		0	7	0	0	0	0	0	0	0	7	[EU940031.1] Fungal sp. M133 isolate M133 18S
Contig AQ1_5E_30	fungi		5	0	0	0	6	0	0	0	0	11	[GU214564.1] Cf. <i>Passalora</i> sp. CPC 11876 18S small subunit ribosomal RNA gene
Contig AQ1b_5E_51	LKM11		0	2	2	1	0	0	0	0	0	5	[FJ577832.1] Uncultured eukaryote clone Joinv23 18S
Contig AQ1b_5E_42	LKM11		0	5	1	1	0	0	0	0	0	7	[EU162635.1] Uncultured fungus clone PFB7SP2005 18S ribosomal RNA gene
Contig AQ1o_5E_48	LKM11		0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	[FJ577832.1] Uncultured eukaryote clone Joinv23 18S ribosomal RNA gene
Contig AQ1_5E_59	LKM11		1	1	11	11	11	4	0	0	0	39	[FJ577832.1] Uncultured eukaryote clone Joinv23 18S ribosomal RNA gene
Contig AQ2o_5E_13	metazoa		0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	[DQ297701.1] <i>Lepadella patella</i> 18S ribosomal RNA gene
Contig AQ1o_5E_06	nuclearia		0	1	1	0	0	0	0	0	0	2	[AB433328.1] <i>Nuclearia thermophila</i> gene for 18S ribosomal RNA
Contig AQ1_5E_58	nuclearia		2	0	0	0	0	0	0	0	0	2	[AY496008.1] <i>Nuclearia</i> sp. 2H small subunit ribosomal RNA gene
Contig AQ1_5E_46	uncertain		2	3	2	0	0	0	0	0	0	7	[AY179990.1] Uncultured dinoflagellate clone CCA32 18S small subunit ribosomal
Contig AQ1_5E_45	uncertain		1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	[DQ995807.1] <i>Lagenoecca</i> sp. antarctica 18S ribosomal RNA gene
Contig AQ2o_5E_66	uncertain		0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	[GU920036.1] Uncultured eukaryote clone F5K2Q4C04IGIGS 18S
Contig AQ1_5E_65	uncertain		3	7	0	15	3	0	0	0	0	28	[AF123596.1] <i>Bolidomonas mediterranea</i> 18S ribosomal RNA gene
Contig AQ2_5E_135	uncertain		0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	[GU214551.1] <i>Mycosphaerella parkii</i> strain CPC 353 18S
Contig AQ1_5E_73	uncertain		1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	[GQ995386.1] Uncultured Chytridiomycota clone T6P1AeE05 18S
Contig AQ1_5E_60	uncertain		1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	[AY303599.1] <i>Bolbocoleon piliferum</i> strain MA3-1b1 18S ribosomal RNA gene
Contig AQ1b_5E_01	alveolata	ciliophora	0	10	1	24	0	0	0	0	0	35	[AY835672.2] Uncultured oligohymenophorean clone IAFDv1 18S
Contig AQ1o_5E_20	alveolata	ciliophora	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	[U80313.1] <i>ESU80313</i> <i>Enchelyodon</i> sp. 16S ribosomal RNA gene
Clone AQ2_5E_45	alveolata	ciliophora	0	0	0	3	0	0	0	0	0	3	[EF024775.1] <i>Oxytrichidae</i> environmental sample clone Elev_18S_1277 18S
Contig AQ1o_5E_44	alveolata	ciliophora	0	0	2	0	0	0	0	0	0	2	[EU264563.1] <i>Aristerostoma</i> sp. ATCC 50986 small subunit ribosomal RNA gene
Contig AQ2b_5E_57	alveolata	ciliophora	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	[DQ103844.1] Uncultured marine eukaryote clone M2_18E08 small
Contig AQ1o_5E_33	alveolata	ciliophora	0	1	1	0	0	0	0	0	0	2	[AY821923.1] Uncultured oligohymenophorid ciliate clone CV1_2A_17 small subunit

# ANNEXES

Contig AQ1o_5E_41	alveolata	ciliophora	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	AY821923.1  Uncultured oligohymenophorid ciliate clone CV1_2A_17 small subunit
Contig AQ1o_5E_45	alveolata	ciliophora	3	0	15	0	2	1	0	0	0	0	21	EU032356.1  Cyclidium glaucoma small subunit ribosomal RNA gene
Contig AL52_5E_48	alveolata	dynophyceae	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2	EF058253.1  Woloszyńska pascheri strain CCAC0075 small subunit ribosomal
Contig AQ2_5E_73	strameno	bacillabiphyta	7	5	0	9	2	0	0	0	0	0	23	AY179994.1  Uncultured stramenopile clone CCA42 18S small subunit
Contig AQ1_5E_110	strameno	bacillabiphyta	9	0	1	5	0	1	0	0	0	0	16	FJ640068.1  Navicula phyllepta strain AP-02-05 18S ribosomal RNA gene
Contig AQ1_5E_90	strameno	chrysophyceae	2	1	15	1	17	34	0	0	0	0	70	Z28335.1  P. vestita (SOTON 1) gene for 18S
Contig AQ1b_5E_14	strameno	oomycetes	0	3	11	1	2	12	0	0	0	0	29	AY486144.1  Pythium insidiosum 18S ribosomal RNA gene
Contig AQ1_5E_26	strameno	labyrinthulida	2	0	0	3	0	0	0	0	0	0	5	AY916582.1  Uncultured eukaryote clone Zeuk76 18S
Contig AQ1o_5E_52	strameno	unclassified	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	AY642710.1  Uncultured eukaryotic picoplankton clone P34.6 18S
Contig AQ1_5E_56	strameno	bacillabiphyta	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	AY179994.1  Uncultured stramenopile clone CCA42 18S
Contig AQ2_5E_100	viridiplantae	chlorophyta	0	0	0	11	0	0	0	0	0	0	11	EU647128.1  Uncultured streptophyte clone D0810_18_M small 99%
Contig AQ2o_5E_54	viridiplantae	chlorophyta	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	GQ122353.1  Nannochloris sp. KMMCC C-179 18S ribosomal RNA gene
Contig AQ2b_5E_10	viridiplantae	chlorophyta	0	2	0	0	11	0	0	0	0	0	13	AY197639.1  Scenedesmaceae sp. Tow 9/21 P-14w 18S ribosomal RNA gene
Contig AQ2b_5E_48	viridiplantae	chlorophyta	0	2	0	0	16	0	0	0	0	0	18	AJ249514.1  Scenedesmus subspicatus 18S rRNA gene
Contig AL52_5E_37	viridiplantae	chlorophyta	0	0	0	0	0	0	0	0	6	6	6	AB256042.1  Rhizoclonium hieroglyphicum gene for 18S rRNA
Contig AL52_5E_36	viridiplantae	chlorophyta	0	0	0	0	0	0	0	0	4	4	4	AB183573.1  Filamentous ulvophyte sp. MBIC10030 gene for 18S rRNA
Contig AL31_5E_01	viridiplantae	chlorophyta	45	0	0	8	0	0	47	38	31	169		AB058346.1  Unicellular ulvophyte sp. MBIC10461 gene for 18S rRNA
	<b>Total</b>		<b>93</b>	<b>73</b>	<b>68</b>	<b>116</b>	<b>88</b>	<b>63</b>	<b>49</b>	<b>38</b>	<b>43</b>	<b>631</b>		

**Annexe 6 : Résumé des données issues du clonage du SSU rDNA des archées  
avec des amorces générales des archées (2A)**

Reference sequence	Taxonomy	Blast (First hit)
Contig AQ1 2A 05 (1 clone)	Archaea	EF444633.1  Uncultured archaeon clone Thp_A_75 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
Contig AQ1 2A 31 (13 clones)	Archaea; Thaumarchaeota	AB113625.1  Uncultured crenarchaeote gene for 16S rRNA, partial sequence, clone: HAdD-MA13